

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

pour l'obtention

DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Mlle Golrokh CHARGHI

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DETERMINATION DE LA MASSE SANGUINE PAR LE RADIOPHOSPHORE

soutenue le 11 Juillet 1956

Jury

MM. M. GUILLOT, Président
G. VALETTE, Professeur
M. PIETTE, Maître de Conférences

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

pour l'obtention

DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

par

Mlle Golrokh CHARGHI

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DETERMINATION DE LA MASSE SANGUINE PAR LE RADIOPHOSPHORE

soutenue le 11 Juillet 1956

Jury :

{ MM. M. GUILLOT, Président
G. VALETTE, Professeur
M. PIETTE, Maître de Conférences



Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. René FABRE, *Doyen*, C. ✱, 🌿 I. Membre de l'Institut.
 DELABY, *Assesseur*, O. ✱, 🌿 I.
 G. CUVIER, *Secrétaire Général*, ✱, 🌿 I.
 MM. JEANDEL, *Secrétaire*, 🌿 I. A. QUILLIOT, *Rédacteur*.
 Mme ESPINASSE, *Rédactrice*, 🌿 A. Mlle DENNY, *Rédactrice*.
 Mme CELLIER, *Commis*, 🌿 A. Mlle MORIN, *Commis*, 🌿 A.
 Mlle LE DOUY, *Commis*.

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut, C. ✱, 🌿 I.	Toxicologie.
DELABRY, O. ✱, 🌿 I.	Pharmacie chimique.
PICON, O. ✱, 🌿 I.	Chimie minérale.
MASCRE, O. ✱, 🌿 I.	Botanique.
JANOT, ✱, 🌿 I.	Pharmacie galénique.
CHARONNAT, ✱, 🌿 I.	Chimie organique.
VALETTE, ✱, 🌿 I.	Pharmacodynamie.
BEDEL, ✱, 🌿 I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS, ✱, 🌿 I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, ✱, 🌿 I.	Physique.
GAUTIER, ✱, 🌿 I.	Chimie analytique.
Mlle LAMBIN, ✱, 🌿 I.	Microbiologie.
RAOUL, 🌿 I.	Zoologie appliquée.
COURTOIS, ✱, 🌿 I.	Chimie biologique.
DOMANGE, ✱, 🌿 I.	Hydrologie et hygiène.
CRÉTÉ, 🌿 I.	Professeur à titre personnel.
CAVIER, 🌿 I.	
MORETTE, ✱, 🌿 I.	
TRUHAUT, ✱, 🌿 I.	
MOREAU, ✱, 🌿 A.	
GUY, 🌿 A.	
GERMAN, 🌿 A.	

Professeur sans chaire.

Doyen Honoraire : M. RADAIS, C. ✱, 🌿 I.

Professeurs Honoraires : M. DELEPINE, C. ✱, 🌿 I. - LEBEAU, C. ✱, 🌿 I.
 HERISSEY, C. ✱, 🌿 I. - LAUNOY, C. ✱, 🌿 I. - FLEURY, O. ✱, 🌿 I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. PIETTE, 🌿 A.	Sciences naturelles.
QUEVAUVILLER, 🌿 A.	Sciences naturelles.
DAMIENS	Sciences physiques et chimiques.
DEYSSON, 🌿 A.	Sciences naturelles.
MALANGEAU	Sciences appliquées.
N.	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences physiques et chimiques.
N.	Sciences naturelles.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

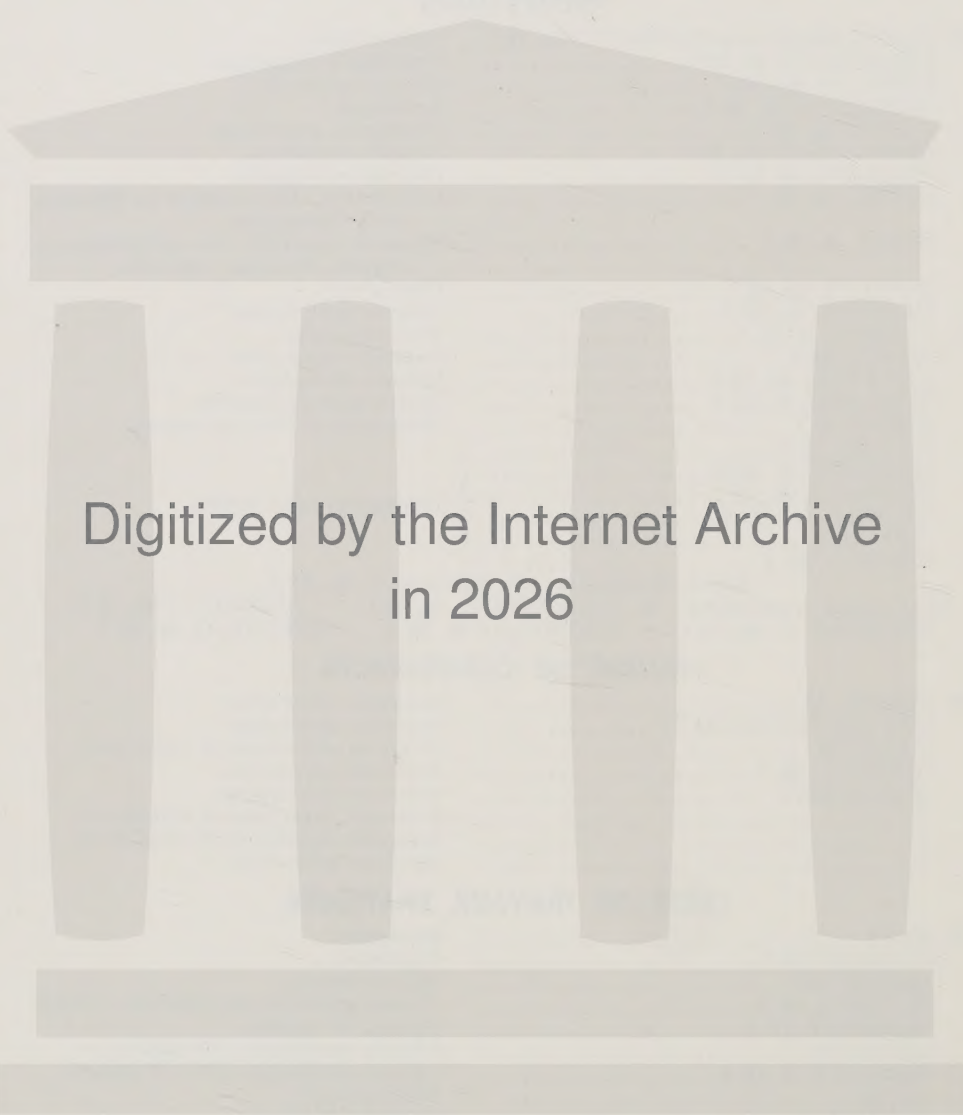
MM. BORY	Sérologie.
CORRIEZ, 🌿 I.	Physique.
DESIGNES	Microbiologie.
HARISPE, 🌿 A.	Chimie générale et pharmaceutique.
MANGEOT, 🌿 A.	Chimie (4 ^e année).
RENAULT J.	Chimie analytique (1 ^{re} année).
RENAULT H. 🌿 A.	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e année).
SAVEL	Parasitologie.
Mlle ROLLEN	Biologie végétale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL, 🌿 A.	Chef de travaux de pharmacotechnie galénique.
WAROLIN	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique.
Mlle MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie

BIBLIOTHÈQUE

<i>Conservateur</i>	M. GARNIER, ✱, 🌿 I.
<i>Bibliothécaires</i>	Mlle LAVAUD, 🌿 I.
	Mme KREHMER.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552423_0003

A Monsieur le Professeur Marcel GUILLOT

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui nous a fait l'honneur de présider
le jury de cette thèse, en témoignage
de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Guillaume VALETTE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

et

A Monsieur Maurice PIETTE

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie
de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,

qui nous ont fait l'honneur d'accepter
de faire partie de notre jury, avec
l'expression de notre profonde gratitude.

A Messieurs les Professeurs de la Faculté de Pharmacie de Téhéran,
les vénérés maîtres auxquels je dois ma formation de pharmacien.

A mes parents,

A tous ceux qui me sont chers.

I N T R O D U C T I O N

La mesure de la masse sanguine est une détermination biologique qui, malgré son importance théorique, est rarement prise en considération dans la pratique clinique. Cela tient aux grandes difficultés de détermination, qu'on utilise une méthode chimique, ou colorimétrique.

L'emploi des indicateurs radioactifs a permis d'améliorer beaucoup la précision technique des résultats obtenus. Mais une très longue mise au point a été nécessaire, avant que les principales causes d'erreurs, qui sont nombreuses, aient pu être mises en évidence, et tournées.

A la demande de Monsieur le Professeur Marcel GUILLOT, nous nous sommes proposé d'abord de faire le point de la question, ensuite de choisir une technique aussi rigoureuse que possible, tout en restant dans le cadre des nécessités pratiques de la biologie hospitalière. C'est ce travail que nous présentons aujourd'hui.

Celui-ci a été effectué à l'Hôpital Broussais dans la Clinique des Maladies du Sang de la Faculté de Médecine de Paris (Professeur Paul CHEVALLIER), ainsi que dans le Laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital. Il comprend quatre parties :

1ère Partie : Position du problème physiologique.

2ème Partie : Technique de détermination de la masse sanguine.

- Les différentes méthodes. Leurs inconvénients a priori.

3ème Partie : Travaux antérieurs sur la méthode au phosphore radioactif.

4ème Partie : Technique de mesure de la masse sanguine par le phosphore radioactif.

- Mode opératoire adopté,
- Précautions à prendre,
- Résultats.

Nous adressons nos sincères remerciements à Monsieur le Professeur Paul CHEVALLIER, Professeur de Clinique des Maladies du Sang à la Faculté de Médecine de Paris, Médecin de l'Hôpital Broussais, dont le bienveillant accueil nous a permis de poursuivre nos recherches dans son service.

Nous remercions tout particulièrement Monsieur le Professeur Marcel GUILLOT, Professeur de physique à la Faculté de Pharmacie de Paris, Pharmacien des Hôpitaux de Paris, qui a bien voulu nous donner à la fois l'appui de sa haute compétence et ses précieux conseils. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre très profonde gratitude.

Que Monsieur Pierre LARUELLE, Pharmacien des Hôpitaux de Paris, Docteur ès Sciences, soit assuré à son tour de toute notre gratitude pour son inlassable dévouement et son généreux concours.

Nous exprimons nos chaleureux remerciements à Messieurs Michel BOIRON, Robert LECONTE des FLORIS et Jean BELAISCH, Ex-Internes du Service de Monsieur le Professeur CHEVALLIER, pour toute leur obligeance.

P R E M I E R E P A R T I E

POSITION DU PROBLEME PHYSIOLOGIQUE

RELATION ENTRE LE SANG ET LES AUTRES SECTEURS LIQUIDES DE L'ORGANISME

L'eau représente approximativement 70 p. 100 du poids de l'organisme humain. Cette quantité d'eau est répartie dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, dans les espaces lacunaires et dans les cellules elles-mêmes.

Les liquides de l'organisme sont partagés en deux grands secteurs hydriques : Secteur cellulaire, Secteur extracellulaire.

SECTEUR CELLULAIRE

Il comprend 50 p. 100 du poids du corps, c'est le liquide contenu dans les cellules du corps, y compris les globules du sang.

Le liquide cellulaire (excepté le liquide contenu dans les hématies) contient très peu de chlore et de sodium; le cation potassium y prédomine, les phosphates et les protéïnes y jouent le rôle d'anions.

La membrane des cellules sépare le liquide cellulaire du liquide extracellulaire, qui généralement constitue le milieu ambiant des cellules.

Cette membrane est caractérisée par une perméabilité sélective; elle est imperméable au sodium, au chlore et aux autres anions, elle est perméable, mais dans une certaine mesure seulement, au potassium et à certains anions; alors que l'eau semble la franchir dans les deux sens.

4,5 p. 100 des liquides cellulaires sont enfermés dans les hématies, elles contiennent relativement beaucoup de chlore.

La membrane des hématies, contrairement à celle des autres cellules est plus perméable aux anions qu'aux cations.

SECTEUR EXTRACELLULAIRE

Représente 20 p. 100 du poids de l'individu, il comprend deux parties bien distinctes :

- Liquide interstitiel = 15 p. 100 du poids corporel
- Plasma sanguin = 5 p. 100 " " "

Le liquide interstitiel et le plasma sanguin sont séparés par l'endothélium capillaire qui se comporte comme une membrane dialysante, perméable à tous les électrolytes, mais imperméable aux molécules protéïques.

A l'opposé du liquide cellulaire, les liquides extracellulaires sont riches en sodium et chlore et pauvres en potassium et phosphates.

Bien que le plasma sanguin et les liquides interstitiels aient une structure physico-chimique presque identique, une différence appréciable les distingue : c'est la présence d'une forte concentration en protéïnes dans le plasma (65 g. p. 1000).

Toutes ces protéïnes ayant un point isoélectrique (5) inférieur au pH du sérum (7,35) subissent une dissociation "acide" et se com-

portent dans le sang comme des anions.

Mais l'électro-neutralité est réalisé des deux côtés de la membrane : c'est-à-dire que le nombre de milliéquivalents (*) acides est égal à celui de milliéquivalents basiques.

RELATION ENTRE LE SANG ET LES LIQUIDES INTERSTITIELS

Le sang et les liquides interstitiels sont séparés par la membrane des capillaires qui se comporte comme une membrane dialysante.

Les électrolytes et les substances diffusibles la franchissent facilement de façon que la composition de ces matières est approximativement la même dans le plasma et les liquides interstitiels; au contraire, les protéïnes sont maintenues dans le plasma à un taux beaucoup plus élevé que dans les liquides interstitiels.

Les protéïnes sanguines qui ne peuvent pas traverser les parois des capillaires, demeurent à l'intérieur des vaisseaux, où par leur pression oncotique, elles attirent et maintiennent l'eau dans les vaisseaux.

Cette pression oncotique est exercée par les micelles lorsqu'elles gonflent par la pénétration d'eau; c'est presque exclusivement la sérum-albumine qui y intervient, les globulines ayant une influence beaucoup plus faible.

Le poids moléculaire de sérum-albumine étant inférieur à celui de sérum globuline, dans un poids égal, le nombre des molécules de

(*) - Un milliéquivalent = $\frac{\text{poids atomique de l'ion (exprimé en mg.)}}{\text{la valence}}$

Le nombre de mEq. d'un corps dissout dans un litre de liquide s'obtient en divisant le nombre de milligrammes contenus dans un litre de liquide par la valeur d'un mEq.

Par exemple, pour le sodium le mEq. a pour valeur 23 pour le Ca = 40/2.

Le nombre de mEq. contenu dans une solution dont la concentration en Na est de 2300 mg/litre, est de $\frac{2.300}{23} = 100$ mEq.

le sérum albumine est bien plus grand que celui des globulines, et par conséquent, la première attire plus facilement l'eau.

De plus, les groupements carboxyliques ionisés sont beaucoup plus nombreux dans la molécule d'albumine que dans celles des différentes globulines, ce qui explique le pouvoir oncotique plus élevé de l'albumine, comparé à celui d'une globuline de poids moléculaire égal.

Nous avons constaté donc, que les protéines, surtout la sérum albumine, jouent un rôle très important dans la répartition de l'eau extracellulaire, et par conséquent, dans le maintien de la masse sanguine.

Dans le capillaire artériel, l'eau du plasma tend à fuir vers les liquides interstiels, sous l'influence de la pression sanguine, force hydrostatique.

Dans le capillaire veineux, l'eau est attirée à nouveau dans le torrent circulatoire en raison de la "pression oncotique" exercée par les protéines du plasma sanguin.

RELATION ENTRE LES LIQUIDES EXTRACELLULAIRE ET CELLULAIRE

Nous avons décrit plus haut que la membrane des cellules est caractérisée par une perméabilité sélective; elle ne se montre rigoureusement imperméable qu'à un très petit nombre de substances.

Les corps dissous franchissent la membrane cellulaire avec des vitesses et des degrés de pénétration différents.

L'EAU est, de toutes les substances, celle qui pénètre le plus librement dans les cellules.

Parmi les substances non dissociées, l'UREE franchit très rapidement et facilement la membrane des cellules des muscles et celle des hématies. Le GLUCOSE aussi, est une des substances qui pénètrent dans les cellules des muscles et des hématies d'une façon très rapide. Les électrolytes, en général, entrent dans les cellules d'une façon pratiquement négligeable.

Parmi les CATIONS, sodium, potassium et calcium pénètrent dans les cellules des muscles lisses tandis que ammonium et potassium rentrent d'une façon lente dans les cellules des muscles striés et que les hématies paraissent imperméables aux cations.

Quant aux ANIONS, les globules rouges sont perméables à divers anions tels que chlore. Il a été démontré aussi, que les polynucléaires du pus et les lymphocytes ont pour les anions ci-dessous un certain degré de perméabilité classé dans l'ordre croissant :

$\text{Cl} - \text{Br} - \text{NO}_3 - \text{SO}_4 - \text{I} - \text{SCN} - \text{Salicylates}$

Le mouvement d'eau entre le secteur extracellulaire et cellulaire est sous la dépendance de la pression osmotique du liquide extracellulaire d'une part, et le métabolisme des cellules, d'autre part.

Toute élévation de la pression osmotique extracellulaire, tend à faire passer de l'eau des cellules vers le secteur extracellulaire, et toute hypotonie osmotique des liquides extracellulaires augmente l'hydratation cellulaire aux dépens des liquides extracellulaires.

Il faut souligner que, dans ces variations de la pression osmotique des liquides extracellulaires, tous les éléments dissous ne jouent pas un rôle identique, et que les phénomènes d'apparence osmotique ne sont pas dus à une imperméabilité totale de la cellule aux éléments dissous dans les liquides extracellulaires, mais à une simple différence dans la rapidité et le taux de pénétration de l'eau et de certains corps dissous.

Les substances de pénétration lente et faible à l'intérieur des cellules, comme chlore et sodium, sont susceptibles d'exercer un pouvoir osmotique puissant sur l'hydratation des cellules.

Au contraire, les corps d'une diffusion facile et rapide comme l'urée, exercent une force osmotique pratiquement nulle.

METHODES GENERALES DE MESURE DES SECTEURS HYDRIQUES

On injecte dans la circulation une quantité connue "A" d'une substance qui se répartit d'une façon homogène et exclusivement dans le secteur à mesurer, puis on dose la concentration "C" dans l'unité de volume et on déduit le volume total "V" du secteur étudié par l'équation suivante :

$$V = \frac{Q}{C}$$

La mesure du volume de ces différents secteurs se fait à l'aide des substances chimiques ayant chacune un "espace de diffusion" limité qui coïncide avec les frontières de ces secteurs (membrane des cellules pour l'eau extracellulaire et paroi capillaire pour l'eau plasmatisque).

a) - MESURE DE L'EAU TOTALE DE L'ORGANISME

Se fait généralement à l'aide des substances ayant de petites molécules, capables de franchir toutes les membranes capillaires et cellulaires, ainsi : l'urée, la thio-urée, la sulfanilamide, l'antipyrine et surtout l'eau lourde ou l'oxyde de tritium ont un espace de diffusion voisin à celui de l'eau totale de l'organisme.

b) - MESURE DES LIQUIDES EXTRACELLULAIRES, CALCUL DE L'EAU CELLULAIRE

Se fait en général avec des produits chimiques dont les molécules sont capables de traverser la paroi des capillaires et qui s'arrêtent à la membrane des cellules, ainsi : le thiocyanate de sodium,

le mannitol, l'inuline, le sodium radioactif, etc... diffusent d'une façon exclusive dans les liquides extracellulaires.

L'évaluation de l'eau cellulaire se fait par différence des deux mesures citées plus haut.

Eau totale - Eau extracellulaire = Eau cellulaire.

c) - MESURE DU VOLUME PLASMATIQUE, CALCUL DE L'EAU INTERSTITIELLE

Les méthodes utilisées pour la mesure du volume plasmatique peuvent être partagées en deux catégories : méthodes directes, méthodes indirectes.

Les méthodes directes : emploient des substances à grosses molécules qui, une fois injectées dans le courant circulatoire se répartissent rapidement et d'une façon homogène, sans franchir les parois capillaires. On utilise surtout divers colorants, dont les plus courants sont : le bleu d'Evans ou T₁₈₂₄, le bleu de Chicago, ou d'autres corps chimiques comme la polyvinylpyrrolidone (Subtosan), la tétraiodophénol-phtaléïne, etc...

Les méthodes indirectes : se font à partir du volume globulaire total. En connaissant le volume total occupé par les globules on peut immédiatement, grâce à l'hématocrite, calculer le volume du plasma.

La mesure du volume globulaire total se fait par les méthodes principales suivantes : l'oxyde de carbone, le fer radioactif, le phosphore radioactif, le chrome radioactif.

Le calcul de l'eau interstitielle se fait par différence des deux données correspondant, l'une à l'eau extracellulaire, l'autre au volume plasmatique, respectivement déterminés par l'une des méthodes ci-dessus.

LE VOLUME SANGUIN - DEFINITION DE LA MASSE SANGUINE

L'organisme humain renferme un volume de sang correspondant à 7,7 p. 100 de son poids. C'est à ce volume total qu'on a donné aujourd'hui la dénomination de masse sanguine ou de volémie.

Le volume de sang est un des responsables de la régulation de la pression artérielle.

La partie liquide du sang - le plasma - est de 5 p. 100 du poids du corps. Dans cette partie liquide sont en suspension : des cellules et des corpuscules, erythrocytes, leucocytes, plaquettes, etc.. dont le volume représente 2,7 p. 100 du poids corporel.

On désigne le volume sanguin par V_S , le volume plasmatique par V_P et le volume globulaire par V_G donc :

$$V_S = V_P + V_G$$

l'hématocrite est le rapport $\frac{V_G}{V_S}$, mesure utilisée fréquemment en clinique et dans un grand nombre de méthodes de mesure de la masse sanguine.

Nous nous promettons de faire un chapitre à part pour l'hématocrite et l'étudier en détail.

VARIATIONS ET REGULATIONS DU VOLUME SANGUIN

Les variations du volume sanguin peuvent être dues à celles de la quantité totale du sang ou à celles de certains de ses composants; on peut avoir ainsi des modifications :

1°) - du volume total du sang diminué après une saignée, ou alors augmenté, après une transfusion du sang.

2°) - du volume globulaire total qui augmente pendant une polyglobulie et diminue en cas d'anémie.

3°) - du volume des leucocytes qui s'accroît dans les leucémies.

4°) - du volume plasmatique qui augmente dans les rétentions de l'eau chez les oedémateux et qui diminue dans les brûlures et dans les états de déshydratation, par exemple, à la suite de diarrhées, sueurs ou polyuries abondantes. La masse totale du plasma diminue alors par perte d'eau et de sels. La concentration protéique et globulaire s'élève.

Le volume du sang dépend d'un équilibre dynamique entre ses composants. Ainsi le volume plasmatique résultera d'un équilibre entre le liquide qui sort des vaisseaux et celui qui rentre, en venant du liquide interstitiel.

Dans les artérioles, les liquides sortent des vaisseaux, par dialyse à travers les parois, à cause de la pression sanguine relativement élevée de nature hydrostatique. Ils sont au contraire attirés dans les veinules, où la pression hydrostatique est plus basse par la pression oncotique des protéines, l'une ayant un effet antagoniste de l'autre, en fait.

La pression artérielle diminue avec la masse sanguine à la suite d'une saignée ou bien d'une hémorrhagie; à ce moment là il y a une restauration partielle du volume plasmatique, due à la pression oncotique des protéines.

D'un autre côté, quand le volume du sang augmente après une injection intraveineuse de soluté salé isotonique, et que la pression du sang s'accroît, la concentration des protéines étant diminuée dans les vaisseaux, l'eau et les sels passent très vite dans les liquides interstitiels pour être ensuite éliminés par les reins. Le volume sanguin total atteint le taux qu'il avait avant injection, en une demi-heure environ. Quand on veut obtenir des augmentations durables du volume sanguin, il est nécessaire d'injecter du plasma sanguin, ou de la sérum albumine, ou des substances colloïdales comme la polyvinylpyrrolidone, qui sont capables d'attirer l'eau des liquides interstitiels à l'intérieur des vaisseaux et de l'y retenir en maintenant, ainsi, la pression sanguine.

Variations physiologiques

Bien que des variations du volume globulaire total ou du volume plasmatique, d'une faible amplitude, puissent facilement se produire chez un sujet sain, le volume sanguin est généralement stable ou peu variable.

L'augmentation ou la diminution du volume globulaire total viennent ici se diluer dans un volume du sang très stable, pratiquement inchangé. En effet, une action régulatrice compense la petite augmentation du volume globulaire par une diminution du volume plasmatique : "là où le volume globulaire augmente, celui du plasma diminue et vice versa" (Cachera). Et cela pour maintenir la stabilité du volume sanguin.

Il arrive qu'une augmentation rapide du volume globulaire soit produite à la suite d'une contraction brusque de la rate qui met en circulation des globules rouges normalement en dépôt, comme dans les émotions, l'exercice, l'anoxie, etc...

Les variations lentes correspondent souvent à une exagération de formation ou à la destruction des globules.

La grossesse produit une augmentation de la masse sanguine ou plus exactement du plasma entre le huitième et le neuvième mois, avec retour à la normale quelques semaines après l'accouchement.

La chaleur cause une augmentation du volume globulaire, par contraction splénique, et du volume plasmatique par passage du liquide interstitiel dans le sang.

Au contraire, le froid produit une diminution de l'eau du sang, l'eau du plasma passant vers les tissus.

Le passage de la position couchée à la position debout peut produire une diminution du volume plasmatique, par un passage d'eau dans les tissus, surtout au niveau des membres inférieurs.

L'altitude donne d'abord une polyglobulie par contraction splénique, puis après un certain temps une augmentation de l'hématocrite par hyperfonctionnement de l'hématopoïèse.

Variations pathologiques

Après une hémorrhagie, le volume sanguin baisse, bien entendu, l'hématocrite reste normal, mais ensuite l'eau des tissus arrive pour rétablir le volume sanguin et diluer le sang. Ainsi l'hématocrite est abaissé et la concentration du plasma en protéines diminuée. La dilution globulaire est d'autant plus grande et dure plus longtemps que la quantité du sang perdue est plus grande.

Après l'hémorrhagie, la rate se contracte et met en liberté ses globules en réserve. Puis l'hématopoïèse se charge, en peu de semaines, de remplacer les globules.

Si l'hémorrhagie se répète fréquemment, ou ce qui revient au même, si on procède à des saignées répétées, on voit apparaître une polyglobulie de réaction, parfois très notable, avec augmentation de l'hématocrite.

Dans les hémococoncentrations où le volume plasmatique diminue, il existe les trois éventualités suivantes :

1°) - L'eau du plasma + des sels plasmatiques sortent du courant du sang et vont dans les tissus.

2°) - L'eau plasmatique + des sels plasmatiques sortent carrément de l'organisme.

3°) - Il y a une perte du plasma même.

Dans le choc traumatique ou chirurgical et dans l'insuffisance surrénale, l'eau et les sels vont dans les tissus, par conséquent, le volume plasmatique diminue progressivement et produit une hémococoncentration qui peut conduire à la mort.

Dans les déshydratations intenses de l'organisme, il y a une anhydrémie avec hémococoncentration. Ce phénomène est observé en cas d'ingestion insuffisante d'eau ou par perte exagérée d'eau hors de l'organisme, comme lors de diarrhées, vomissements répétés, sueurs abondantes, polyuries, oedèmes pulmonaires, etc...

La masse sanguine diminue dans les brûlures où l'hématocrite

augmente surtout à cause d'une perte considérable du plasma au niveau de la surface brûlée.

Dans les anémies, le volume sanguin est peu diminué, car la diminution des erythrocytes est habituellement compensée par une augmentation du volume plasmatique.

Chez les néphrétiques, le volume plasmatique peut être normal ou augmenté, tandis que le volume globulaire est généralement abaissé.

Dans l'obésité, le volume sanguin est réduit par rapport au poids du sujet, mais il est normal par rapport à la surface corporelle.

Dans les leucémies, il y a une augmentation du nombre des leucocytes et souvent du volume plasmatique.

Dans la polyglobulie essentielle, ou maladie de Waquez, nous observons une franche augmentation du volume sanguin avec une polyglobulie vraie et le volume plasmatique est diminué en général. Une augmentation semblable a été observée dans l'anémie chronique d'origine pulmonaire ou cardiaque, avec hématokrite augmenté.

L'hyperconcentration du sang en erythrocytes produit une augmentation de sa viscosité qui, jointe à l'hypervolémie, provoque une augmentation du travail cardiaque et on observe une tendance au ralentissement de la vitesse circulatoire.

Lorsqu'il se produit une insuffisance d'irrigation de certains organes et, par suite, un apport insuffisant d'oxygène, on constate une diminution du volume plasmatique avec hémococoncentration. Il en résulte une augmentation de la perméabilité capillaire et une transsudation plus importante d'eau et de protéines plasmatiques. Cette transsudation, la diminution du volume plasmatique, l'hypotension et l'anoxie conduisent à la mort s'ils ne sont pas combattus par des transfusions adéquates de sang, de plasma ou de sérum albumine.

Quelle est la quantité de sang pouvant être perdue
sans conséquences fatales ?

Il faut distinguer les pertes brusques des pertes lentes ou espacées. Dans ce dernier cas, le sang se régénère dans l'intervalle des saignées, on arrive à perdre au total une quantité de sang très importante.

Une hémorrhagie brusque est bien supportée, jusqu'à 1 p. 100 du poids corporel; quand elle atteint 3 p. 100 du poids, elle provoque des symptômes très nets et souvent dangereux.

Elle est caractérisée par une hypotension artérielle considérable et l'accélération du rythme cardiaque. L'hémorrhagie est le plus souvent mortelle lorsqu'elle dépasse 4,5 - 5 p. 100 du poids du corps.

L'HEMATOCRITE

L'hématocrite se rattache au rapport erythro-plasmatique. On l'exprime par le volume des globules rouges dans 100 cm³ du sang total.

Le sang rendu incoagulable par l'héparine sèche ou le mélange de Wintrobe^(*), est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 30 minutes dans des tubes gradués et bien calibrés (tubes de Wintrobe). Les globules rouges se déposent dans le fond du tube d'hématocrite sous une petite couche de 1 - 2 mm de leucocytes au-dessus de laquelle surnage le plasma sanguin.

L'hématocrite moyen a été évalué à 47 p. 100 chez l'homme et 42 p. 100 chez la femme, nous prendrons le chiffre théorique, géné-

(*) 1,2 mg. d'oxalate d'ammonium + 0,8 mg. d'oxalate de potassium pour 1 cm³ du sang total.

ralement adopté de 45 p. 100.

Ce chiffre obtenu par centrifugation du sang veineux ne donne pas la valeur réelle du rapport du volume globulaire au volume du sang total. Trois corrections suivantes sont indispensables à faire :

1.- La centrifugation ne sépare pas d'une façon stricte tout le plasma des globules qui en retiennent toujours une quantité inconnue. Un groupe de chercheurs⁽¹⁾ a constaté que cette quantité de plasma restant entre les globules est de l'ordre de 5 p. 100 du volume de la couche globulaire : le volume globulaire vrai serait donc égal seulement à :

$$h \times 0,95$$

Plus récemment un autre groupe de chercheurs⁽²⁾ l'a estimé à 2 p. 100 du volume du culot globulaire et pour ces auteurs, le volume globulaire vrai serait donc de :

$$h \times 0,98$$

En France, Hartmann et Loverdo⁽³⁾, à l'aide d'albumine marquée par I^{131} , ont mesuré la rétention du plasma dans le culot globulaire et l'ont estimé à 5 p. 100. Pour ces derniers le volume globulaire vrai serait de :

$$h \times 0,95$$

2.- La couche leucocytaire occupant normalement 1 cm^3 p. 100 est généralement négligée, mais il n'en est pas ainsi dans les cas de forte leucocytose, dans les leucémies par exemple, où cette couche s'épaissit d'une façon considérable et retient une quantité importante du plasma.

3.- Grâce à l'emploi des globules marqués par des isotopes radioactifs, il a été trouvé que l'organisme contient seulement 70 - 75 p. 100 du nombre des globules rouges calculés d'après les résultats de l'hématocrite veineux⁽⁴⁾.

Cette différence est due non seulement aux deux causes d'er-

reurs citées plus haut, mais aussi à ce que, la concentration en globules du sang artériel ou veineux est plus grande que celle du sang des petits vaisseaux. Ainsi le rapport $\frac{\text{globules}}{\text{sang total}}$ qu'indique l'hématocrite veineux, est toujours supérieur à la proportion entre le volume globulaire total et le volume sanguin total du corps. Ce dernier rapport, l'hématocrite somatique est appelé "Body hematocrite" par les auteurs américains.

Il a été montré que l'hématocrite somatique est en rapport constant avec l'hématocrite veineux⁽⁵⁾ et cette valeur a été estimée

$$\text{à :} \quad \frac{\text{hématocrite somatique}}{\text{hématocrite veineux corrigé}} = 0,91$$

donc, hématocrite somatique = hématocrite veineux x 0,95 x 0,91,
d'où, l'hématocrite somatique = hématocrite veineux x 0,865.

Ces correctifs sont très importants pour la détermination du volume sanguin total, lorsque celle-ci tient compte de l'hématocrite veineux.

L'hématocrite, indiquant seulement le volume des globules rouges dans 100 cm³ du sang est une grandeur relative qui ne permet naturellement aucune déduction valable sur la quantité réelle de globules en circulation, et pour apprécier la quantité absolue des globules en circulation il faut mesurer le volume globulaire total.

RELATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES ENTRE L'HEMATOCRITE, LE VOLUME GLOBULAIRE ET LE VOLUME SANGUIN TOTAL

Les variations du volume du sang total peuvent se désigner à l'aide de la terminologie proposée par Rowntree. Le volume normal du sang se nomme normovolémie, sa diminution hypovolémie et son augmentation hypervolémie.

Chacun de ces trois états volémiques peut donner naissance à

trois variétés suivant que leur hématoците est normal, diminué ou augmenté. On peut donc distinguer ainsi neuf états.

DANS LA NORMOVOLÉMIE.- Les variations du volume globulaire et du volume plasmatique sont dans des sens opposés, c'est-à-dire que si le volume plasmatique augmente, le volume globulaire diminue. L'hématoците reste proportionnel au volume globulaire total.

Volémie	h	V _G	V _P
normal	N	N	N
	+	+	-
	-	-	+

DANS L'HYPOVOLEMIE ET L'HYPERVOLEMIE.- Malgré les multiples combinaisons, on pourrait les classer d'une façon générale en deux groupes :

- les volémies anormales chroniques
- les volémies anormales aiguës

En général dans les anomalies chroniques du volume sanguin où il y a une hypo ou une hypervolémie, l'hématoците et le volume globulaire total s'accroissent ou diminuent dans le même sens, sans aucune proportionnalité, par exemple : chez les polyglobuliques la volémie, le volume globulaire et l'hématoците, augmentent ensemble. Le volume globulaire est donc plus anormal encore que l'hématoците ne le laisserait penser.

Inversement chez les anémiques, la volémie, le volume globulaire et l'hématoците sont, à la fois, abaissés. Si bien que le volume

globulaire total est plus bas que ne l'indique l'hématocrite. Cependant, chez les oedémateux, il n'en est pas ainsi, le sang est dilué par l'hyperhydratation, la volémie augmentée, bien que l'hématocrite soit abaissé et que le volume globulaire total soit normal.

Par contre, dans les volémies anormales aiguës, les trois valeurs varient d'une façon indépendante, par exemple, dans les plasmorrhagies où il y a une perte importante du plasma sanguin, la volémie est abaissée, l'hématocrite est augmenté, le volume globulaire total reste inchangé.

Dans les hémorrhagies, on trouve chez le malade une volémie et un volume globulaire total diminués, tandis que l'hématocrite peut rester normal. C'est exactement ainsi dans les anémies vraies où l'hématocrite pourrait être normal, en même temps que le volume sanguin et le volume globulaire diminués. C'est un cas très important et, écrit Jean Bernard, "On soupçonne chez certains tuberculeux de telles anémies, méconnues en raison de l'imperfection actuelle de nos méthodes de mesure".

On peut classer les hyper et les hypovolémies dans le tableau suivant d'après la classification de Rowntree.

Volémie	h	V _G	V _P	Observations
Augmentée	N	+	+	Transfusion du sang.
	+	+	-	Polyglobulie vraie
	-	N	+	Hydrémie-Transfusion du plasma
Diminuée	N	-	-	Anémie vraie-Hémorrhagies aiguës
	+	N	-	Plasmorrhagie
	-	-	+	Anémie chronique

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA MASSE SANGUINE

Comme nous l'avons précisé plus haut, le volume sanguin est la somme du volume plasmatique V_P et du volume globulaire V_G .

Les différentes méthodes pour mesurer le volume du sang peuvent être classées en deux groupes :

a) - Méthodes directes : On mesure directement le volume du sang ou alors on détermine séparément les valeurs du volume plasmatique et du volume globulaire, et on additionne ensuite ces deux valeurs.

b) - Méthodes indirectes : On se base uniquement sur la mesure d'un des deux composants du volume du sang; soit le volume plasmatique, soit le volume globulaire. Dans ce cas il est bien évident que pour arriver à calculer le volume sanguin il faut connaître le rapport V_G/V , autrement dit, l'hématocrite somatique, différent de l'hématocrite veineux, facilement mesurable, mais en rapport constant avec lui.

Nous sommes conduit à envisager respectivement ces deux groupes de mesures. Nous nous bornerons à signaler quelle méthode chaque auteur a employée, quels résultats il a obtenus.

Nous exposerons à part la méthode au phosphore radioactif, que nous traiterons plus en détail, puisque c'est elle que nous avons utilisée.

a) METHODES DIRECTES

I - METHODE DE SAIGNEE⁽⁶⁾

La première méthode était celle de Welcker (1854), méthode à laquelle on compare les procédés récents. Elle consiste à faire d'abord une dilution de 1 p. 100 avec le sang artériel de l'animal dans l'eau distillée. On saigne totalement l'animal; on lave tout le système vasculaire avec de l'eau distillée; puis on coupe l'animal en morceaux qu'on fait macérer dans de l'eau. On mélange le sang extrait au début avec les liquides de lavage et de macération. On ajoute de l'eau pour obtenir la couleur de l'échantillon de sang dilué à 1 p.100. La quantité finale du liquide divisée par 100, correspond au volume du sang de l'animal.

Welcker, par cette méthode avait obtenu une masse sanguine moyenne de 7,7 p. 100 du poids du corps, pour les chiens de petite taille, 6,6 p. 100 pour les gros chiens. Il existe, en outre, de fortes variations dans chaque groupe.

La méthode citée a été appliquée à l'homme par Bischoff (1855) sur deux criminels condamnés à mort. Il a trouvé alors une masse sanguine égale à 7,7 p. 100 du poids corporel.

La méthode a été modifiée⁽⁷⁾ par Malassez (1874) en lavant le système vasculaire avec un liquide conservateur des globules rouges (sérum formolé de Marciano). Avant l'opération, on a évalué le nombre des globules rouges contenus dans 1 mm³ de sang prélevé sur l'animal vivant. Connaissant ensuite le volume total du liquide employé pour le lavage, il est facile d'en déduire le volume total du sang.

Les résultats trouvés par Malassez étaient aussi de 7,7 p. 100 du poids corporel.

Inconvénients

Nous savons aujourd'hui que cette méthode, non applicable en clinique, présente des causes d'erreurs importantes.

1.- Le sang périphérique et le sang profond n'étant pas identiques en composition, la mesure de l'hémoglobine et la numération globulaire ne peuvent pas donner des résultats valables.

2.- L'hémoglobine et les globules rouges entraînés dans l'eau de lavage proviennent aussi bien du sang que des muscles et des organes (globules rouges soustraits de la rate, hémoglobine du muscle).

II - METHODE A L'OXYDE DE CARBONE

Grehant et Quinquaud^(8,9,10), pour la première fois (1882), ont utilisé chez plusieurs animaux une méthode à l'oxyde de carbone. Haldan et Smith⁽¹¹⁾ l'ont appliquée chez l'homme (1900). Elle a été perfectionnée par Chang et Harrop⁽¹²⁾ en (1927), et depuis cette date divers auteurs l'ont modifiée et utilisée⁽¹³⁾.

La méthode est basée sur la combinaison de l'hémoglobine des globules rouges avec l'oxyde de carbone.

Technique : Connaissant la quantité de l'oxyde de carbone qui serait nécessaire pour saturer 100 cm³ du sang du sujet (20 cm³ par exemple), on lui fait respirer une quantité connue d'oxyde de carbone (110 cm³ par exemple).

On détermine sur un échantillon de sang prélevé 5 minutes plus tard, la quantité de gaz fixée sur les hématies.

En général, pour un sujet normal, cette quantité représente 12 p. 100 de la capacité de saturation totale.

$$110 \times \frac{100}{12} = 916 \text{ cm}^3$$

représente la quantité de CO qui aurait été nécessaire pour saturer

tout le sang de ce sujet. Mais, comme à saturation totale, la fixation de 20 cm^3 du gaz correspond à un volume de 100 cm^3 du sang par exemple, le volume total du sang du sujet serait de :

$$100 \times \frac{916}{20} = 4.580 \text{ cm}^3.$$

Les résultats anciens présentaient un volume du sang égal à environ 8,2 p. 100 du poids du corps, tandis que les résultats modernes, depuis Chang et Harrop, indiquent une volémie comprise entre 7,1 et 7,5 p. 100 du poids corporel.

Inconvénients

1.- L'oxyde de carbone se fixe aussi sur la myoglobine, d'où une erreur par excès.

2.- A cause de sa toxicité, l'oxyde de carbone doit être utilisé avec prudence et les quantités permises sont loin de la saturation, ce qui diminue la précision de cette technique.

3.- On ne doit pas se servir de cette méthode dans les cas d'anémies et d'insuffisances cardiaques.

4.- Cette méthode mesure en réalité la masse globulaire parce que le CO ne se fixe que sur les hématies. En tenant compte de la capacité de saturation du sang on introduit le rapport entre les volumes plasmatique et globulaire dans le prélèvement, autrement dit l'hématocrite. Le fait que le sang des grands vaisseaux et le sang capillaire n'ont pas la même concentration en globules, rend la méthode inexacte, mais comme nous le verrons, cette erreur n'est pas très grande.

Enfin des travaux modernes, effectués avec l'oxyde de carbone marqué au C^{14} ont montré qu'une partie du gaz toxique se fixait sur le foie et échappait à l'estimation faite sur le sang. Ce peut être une cause d'erreur supplémentaire.

III - METHODE DE LA DILUTION DES GLOBULES

La méthode est due à Philipps, Dole, Farr et Vanslyke⁽¹⁴⁾. On fait un prélèvement de sang sur lequel on effectue, soit un dosage d'hémoglobine (Hb_1), soit une mesure de la densité (D_1), soit simplement une détermination de l'hématocrite (h_1).

Technique : On injecte au sujet un volume connu de plasma humain normal isotonique, dans la veine du pli du coude. On évalue alors au bout de 5 minutes sur un deuxième échantillon de sang prélevé à l'autre bras, la quantité d'hémoglobine (Hb_2), ou la densité du sang (D_2), ou l'hématocrite (h_2).

Si l'on se base sur la densité, il faut également mesurer la densité du plasma injecté (d).

Le (v) étant le volume connu du plasma injecté, les formules suivantes donnent directement le volume du sang avant l'injection :

$$V = v \frac{D_2 - d}{D_1 - D_2}$$

$$V = v \frac{Hb_2}{Hb_1 - Hb_2}$$

$$V = v \frac{h_2}{h_2 - h_1}$$

Inconvénients

Cette méthode ne donne que des résultats approximatifs entachés d'une erreur de + 15 p. 100. En effet, une partie de l'eau du plasma injecté peut disparaître du circuit sanguin. La méthode peut cependant rendre de grands services en clinique, dans les cas urgents.

IV - METHODE DES GROUPES SANGUINS⁽¹⁵⁾

Technique : On injecte, par exemple, $M \text{ cm}^3$ de sang du groupe O contenant un nombre connu N de globules rouges par mm^3 à un sujet de groupe A ou B.

Après 15 minutes, on prélève avec une pipette hématimétrique du sang du malade et on le dilue à un taux connu ($1/300$ par exemple) avec un sérum du groupe O. Le sérum du groupe O contenant des agglutinines anti A et anti B agglutinera les globules rouges du sujet. En comptant par mm^3 le nombre n des hématies non agglutinées, forcément du groupe O, on peut savoir dans quelle proportion elles ont été diluées dans le sang total du sujet A ou B, et par un calcul de dilution le volume sanguin du sujet A ou B :

$$v = \frac{M \times N}{n}$$

Inconvénients

1.- Deux numérations globulaires donnent naissance à une erreur assez importante.

2.- De nombreux globules étant réunis en conglomerats assez volumineux, la dilution par la pipette hématimétrique est beaucoup moins précise que d'habitude. En particulier, il est difficile de prélever dans un tube capillaire du sang où ces conglomerats soient dans la même proportion que dans le mélange initial. La méthode ne deviendrait précise que si le volume du sang observé était grand.

3.- La méthode ne peut pas être appliquée à un sujet du groupe O.

4.- L'erreur d'hématocrite est ici peu importante à côté des trois précédentes.

b) METHODES INDIRECTES

Dans cette catégorie de méthodes, on se base uniquement sur la mesure du volume globulaire ou du volume plasmatique. On peut se contenter de calculer ensuite le volume total du sang à l'aide de l'hématocrite.

Au contraire, la mesure directe exacte de la masse sanguine consiste à mesurer séparément chacun des volumes plasmatique et globulaire, et à additionner ces deux valeurs.

Il faut remarquer que certaines méthodes examinées dans le chapitre précédent sont en réalité des méthodes de mesure de la masse globulaire. Nous les avons cependant classées avec les procédés directs, car elles utilisent le sang total et sont exemptes des erreurs de mesure de l'hématocrite, sinon des conséquences de la variation de répartition des globules dans le système vasculaire.

Parmi les substances qui servent à mesurer le volume plasmatique, les plus importantes sont : les colorants, la polyvinylpyrrolidone et la tétraiodophénol-phtaléïne.

Pour mesurer le volume globulaire total on utilise les radioéléments artificiels (fer radioactif, chrome radioactif, phosphore radioactif).

MESURE DU VOLUME PLASMATIQUE

I - METHODE AUX COLORANTS

Depuis Keit, Rowntree et Geraghty (1915) qui furent les inventeurs de cette méthode, différents colorants tels que : le rouge vital, le rouge brillant vital, le rouge Congo, le bleu trypan, le bleu d'Evans ou T₁₈₂₄, le bleu de Chicago 6B⁽¹⁶⁾, le bleu Geigy⁽¹⁷⁾

ont été utilisés.

Aujourd'hui, les trois derniers produits étant les plus employés, nous nous contenterons ici de décrire la méthode au bleu de Chicago et celle au bleu Geigy.

Principes généraux. - Lorsqu'on injecte un produit colloïdal dans une veine, sa concentration locale, très forte au point d'injection, baisse pendant les quelques minutes nécessaires à sa dilution dans tout le plasma. Il est ensuite éliminé très lentement.

Des prélèvements répétés à partir du moment de l'injection montrent donc d'abord une décroissance rapide (diffusion) et ensuite lente (élimination) du taux du produit dans le sang.

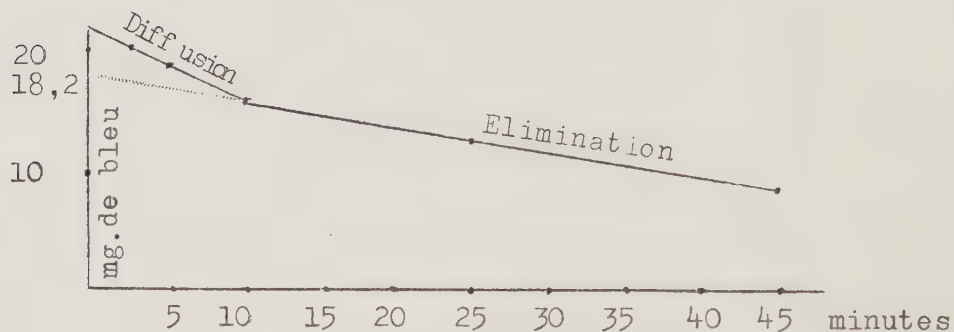


Fig.1 : Epreuve de bleu de Chicago d'après Cachera et Barbier (1942)

La courbe (Fig.1) est composée de deux segments : le segment de diffusion et le segment d'élimination.

Pour que la mesure du volume plasmatique soit exacte, il faut supprimer le facteur d'élimination, en calculant la concentration C du produit correspondant à une diffusion théorique instantanée au temps zéro. Q étant la quantité injectée, le volume plasmatique V sera fourni par :

sera fourni par :

$$V = \frac{Q}{C}$$

Cela peut être réalisé sur le graphique en prolongeant vers la gauche le segment d'élimination : son point de rencontre avec l'axe des ordonnées donne la concentration demandée.

Lorsqu'il s'agit d'un corps qui ne s'élimine pratiquement pas par l'urine, on admet que, passée la période de "diffusion" la concentration plasmatique reste à peu près constante pendant un certain temps et dans ce cas un prélèvement seul suffira pour donner la concentration C, et le volume plasmatique est ensuite calculé par la même formule.

S'il s'agit d'un produit éliminé par les reins, il est indispensable de doser la quantité du produit excrétée dans l'urine entre le moment de l'injection et le moment du prélèvement sanguin, et la formule ci-dessus sera remplacée par :

$$V = \frac{Q - E}{C}$$

dans laquelle E représente la fraction éliminée par l'urine.

Méthode au bleu de Chicago⁽¹⁶⁾

Le sujet doit être à jeûn depuis la veille pour éviter que le sérum ne soit trouble. Il doit rester en position de repos complet pendant toute la durée de l'expérience.

Prélever d'abord 10 cm³ du sang à la veine du pli du coude dans un tube à centrifuger contenant de l'héparine.

Sans enlever l'aiguille, injecter la solution de bleu, à 0,5 p. 100, à la dose de 2 cm³ par kilogramme du poids corporel.

A la 4ème, 7ème, 10ème minute^(*) après l'injection on prélève au bras opposé des échantillons de sang dans des tubes à centrifuger contenant de l'héparine sèche.

Les quatre échantillons de sang sont centrifugés, en évitant l'hémolyse, et les plasmas surnageants sont séparés des culots globulaires.

Il est donc facile de déterminer, par simple lecture photométrique, la teneur du plasma en colorant.

Les trois plasmas colorés sont examinés au photomètre, préalablement réglé au zéro sur le plasma pur du même sujet, en utilisant l'écran rouge. Les chiffres lus au photomètre sont ensuite rapportés sur une courbe d'étalonnage.

On construit un graphique portant en abscisses les temps de prélèvement après l'injection et en ordonnées les concentrations correspondantes, lues sur la courbe d'étalonnage. La courbe ainsi obtenue doit être sensiblement une ligne droite.

On la prolonge vers la gauche jusqu'à son intersection avec l'axe des ordonnées et on lit la concentration C au temps zéro.

Q étant la quantité injectée, le volume plasmatique est fourni par la formule déjà vue.

Les résultats obtenus par cette méthode sont d'environ 4 p. 100 du poids corporel (5 p. 100 d'après Cachera et Barbier).⁽¹⁶⁾

Méthode au bleu Geigy 536^(17,18)

Ce colorant, grâce à son poids moléculaire élevé, ne s'élimine que lentement et présente d'autre part l'avantage de posséder un spectre d'absorption différent de celui de l'hémoglobine et des pigments qui en dérivent, ce qui évite les erreurs dues à une hémolyse ou

(*) Les prélèvements de sang doivent être faits après un délai suffisant pour que la période dite de diffusion soit terminée. Ce délai doit être déterminé par l'expérience pour chaque substance étudiée.

un ictère.

Technique : Le sujet doit être soumis à une diète intégrale de 12 - 14 heures avant l'épreuve, afin d'éviter une augmentation de la lipémie qui viendrait fausser le résultat de la mesure.

Aspirer 5 cm³ de colorant à 0,5 p. 100 à l'aide d'une seringue et les introduire dans un ballon jaugé de 100 cm³; cette dilution (25 mg. p. 100 environ) sert à compenser les erreurs dues à la seringue. Elle est utilisée pour faire ensuite des étalons photométriques. Remplir à nouveau la seringue avec le colorant et la tenir prête pour l'injection.

Prélever à l'aide d'une seringue 20 cm³ environ de sang et sans sortir l'aiguille de la veine, détacher la seringue et recueillir le sang dans un tube à centrifuger contenant une goutte d'héparine.

Sans retirer l'aiguille, injecter alors 5 cm³ de colorant sans rincer la seringue avec du sang. 10 à 15 minutes plus tard prélever dans la veine de l'autre bras 5 cm³ environ de sang.

Mesure : Les 20 cm³ du sang prélevés au début vont servir à déterminer l'hématocrite veineux et à faire avec le plasma, après centrifugation, deux dilutions de colorant servant de témoins.

Centrifuger les deux tubes de sang (le restant des 20 cm³ du sang et 5 cm³ d'échantillon prélevé après l'injection) pendant 20 minutes à 2000 tours par minute.

Dans 4 tubes bien secs introduire :

1	Solution à 25 mg. p. 100	0,2 cm ³	(solution contenant 1,25 mg.
	plasma	3,8	(p. 100.

2	dilution précédente	2 cm ³	(solution contenant 0,83 mg.
	plasma	1	(p. 100

3	plasma coloré du malade	3 cm ³
---	-------------------------	-------------------

4 plasma témoin..... 3 cm³

Déterminer les densités optiques des quatre plasmas au photomètre de Lagaillard en utilisant l'écran jaune orangé n° 71(6050 Å)

Posons :

a = le nombre de cm³ de la solution injectée.

C = titre en colorant de la solution injectée en g. p. 100.

C₁ = " " " " " diluée " " .

N = densité optique du plasma témoin.

N₁ = " " de la solution diluée de colorant dans le plasma.

N₂ = " " du plasma coloré prélevé

$$\text{Volume plasmatique} = \frac{a \times C}{C_1} \times \frac{N_1 - N}{N_2 - N}$$

Le résultat doit être le même, que l'on prenne comme référence l'une ou l'autre des deux solutions plasmatiques de colorant. Si N₁ - N est très différent de N₂ - N, on prépare une solution diluée avec une autre quantité que les 0,2 cm³ utilisé précédemment, de telle sorte que les densités optiques des deux plasmas colorés soient très voisines.

Nous avons utilisé la méthode au bleu Geigy pour déterminer le volume plasmatique chez 15 malades^(*), et nous avons trouvé une moyenne de 5 p. 100 du poids corporel.

Nous avons essayé, au cours de trois expériences, de construire la courbe d'élimination, en prélevant des échantillons de sang, 10, 20 et 30 minutes après l'injection de colorant. La densité optique des trois échantillons étaient parfaitement identiques.

(*) Les malades étaient des sujets cardiaques hospitalisés dans le service de cardiologie de l'Hôpital Broussais (Professeur Marcel Charles Mouquin).

Inconvénients

Cette méthode comporte des difficultés et des inconvénients importants.

La lecture au photomètre devient difficile lorsque le plasma n'est pas limpide, en cas d'hyperlipémie, ou teinté en rouge par suite d'une hémolyse. L'expérience montre que dans de pareils cas la marge d'erreur devient très importante.

Les colorants se fixent toujours un peu sur les capillaires et sur les parois des vaisseaux en général. Leur fixation par les éléments figurés du sang est probable.

Le tissu réticulo-endothélial est capable d'en soustraire des quantités assez importantes du torrent circulatoire (50 p. 100 au bout d'une heure).

On est pris, somme toute, entre deux exigences contradictoires : prendre un colloïde à grosses molécules qui ne passe pas du tout dans l'urine mais qui est fixé électivement par le tissu réticulo-endothélial, ou prendre un colorant de moindre poids moléculaire qui présente l'inconvénient de s'éliminer un peu par la voie rénale.

Hamburger et Maté ont trouvé que le liquide d'ascite des sujets atteints de cirrhose du foie se colorait en bleu dans les heures suivant l'épreuve au bleu de Chicago. Il n'est donc pas impossible que dès les premières minutes, une partie non négligeable de la substance quitte le plasma.

Cardozo (1940) qui étudia spécialement le passage du colorant dans le système lymphatique, arrive à la conclusion suivante : "Le passage du colorant dans la lymphe intervient dans toute interprétation correcte de la courbe de disparition établie par Gibson et Evans et provoque, en général, une appréciation trop élevée du volume plasmatique.

Un inconvénient pratique de la méthode au colorant est la coloration que les téguments gardent parfois assez longtemps après l'épreuve.

En résumé, après l'injection du colorant, on ne retrouve plus, dans le plasma, qu'une partie de la substance injectée, d'où une erreur qu'il est difficile de chiffrer.

II - METHODE AU POLYVINYLPIRROLIDONE⁽¹⁹⁾

Cette méthode analogue à celle des colorants colloïdaux, est basée sur l'emploi de la polyvinylpyrrolidone (Subtosan), colloïde de poids moléculaire variable de 25.000 à 60.000 environ, qui reste très longtemps dans le lit vasculaire.

Technique : Le sujet doit être à jeûn depuis la veille pour éviter que son sérum soit trouble.

Injecter par voie intraveineuse 10 cm³ d'une solution de Subtosan à 25 p. 100 (soit 2,50 grammes) exactement mesurés. Dix minutes après l'injection, effectuer un prélèvement de sang au bras opposé sur oxalate ou fluorure de sodium en poudre, dans un tube à centrifuger gradué en dixième de cm³. Après la centrifugation, noter l'hématocrite. Doser alors le polyvinylpyrrolidone dans le plasma surnageant d'après la technique suivante :

Réactifs nécessaires.-

1.- solution de sulfate de zinc :

sulfate de zinc cristallisé à 7 H ₂ O.....	10 g.
eau distillée q.s.p.	100 cm ³

2.- Solution de soude N/2

3.- Solution iodo-iodurée :

Iode	0,50 g.
Iodure de potassium	1 "
Eau distillée q.s.p.	100 cm ³

Etablissement de la courbe d'étalonnage.- Diluer au 1/1000 la solution de Subtosan à 25 p. 100 de façon à obtenir une solution à 250 γ par cm^3 . Préparer, en partant de cette dernière solution, une série de solutions-étalons de Subtosan de 10 cm^3 , renfermant respectivement 125 - 250 - 375 - 500 - 750 et 1000 γ pour 10 cm^3 . Ajouter dans chacun des échantillons 1 cm^3 de la solution iodo-iodurée. Laisser attendre 5 minutes; il se développe une coloration brun acajou. Faire une lecture photométrique de chaque échantillon.

Construire une courbe en portant en abscisse les concentrations et en ordonnées les degrés photométriques.

Dosage du plasma.- Le plasma séparé de ses globules est déféqué de façon suivante :

Dans une éprouvette, introduire dans l'ordre, en mélangeant après chaque addition :

plasma.....	2 cm^3
eau distillée.....	16 "
NaOH N/2	1 "
Solution de sulfate de zinc.....	1 "

Centrifuger à grande vitesse et prélever 10 cm^3 du liquide surnageant parfaitement clair (correspondant à 1 cm^3 de plasma) et ajouter 1 cm^3 de la solution iodo-iodurée.

Après 5 minutes, faire une lecture au photomètre et porter la valeur lue sur la courbe d'étalonnage pour connaître la concentration correspondante.

Le rapport $\frac{\text{Polyvinylpyrrolidone injectée (2,50 g.)}}{\text{polyvinylpyrrolidone par litre de plasma}}$ donne le volume plasmatique.

On calcule ensuite le volume du sang total en multipliant par le rapport $\frac{V \text{ du sang total}}{V \text{ du plasma}}$ qui est connu d'après l'hématocrite.

Les résultats obtenus par Duizend⁽²⁰⁾ varient de 3,3 à 6,2 p. 100 du poids corporel. La moyenne est de 4,5 p. 100.

Inconvénients

Poullain et Piette⁽¹⁹⁾ ont trouvé chez un même malade un volume plasmatique de 3.750 cm^3 avec le bleu de Chicago, et de 4.170 cm^3 avec le Subtosan. Etant donné que l'élimination du Subtosan est pratiquement plus lente que celle du bleu et que sa fixation par le système réticulo-endothélial et les hématies est regardée comme nulle par ces derniers auteurs, le volume plasmatique mesuré par le bleu devrait être plutôt plus grand que celui mesuré avec le Subtosan. Le fait d'avoir trouvé un chiffre de plasma plus élevé au moyen du Subtosan, correspondrait à une perte ou à une mesure imprécise de la concentration en polyvinylpyrrolidone. En effet, la polyvinylpyrrolidone ne représente pas un corps défini, mais un mélange de molécules diversement polymérisées, les unes relativement petites, les autres volumineuses; ce qui est la cause d'un dosage imprécis du produit.

Il est permis de penser, de plus, que les molécules de différentes tailles ne donnent pas toutes une réaction de même intensité avec l'iode. Enfin, il est certain que les plus petites de ces molécules franchissent la barrière rénale.

Nous avons fait de nombreux essais de dosage par cette méthode, en utilisant divers variants. Nous avons en particulier essayé de doser le Subtosan par le trouble qu'il donne en solution diluée avec une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Les lectures au photomètre sont précises en elles-mêmes, mais le trouble évolue dans le temps et cette évolution est fonction de la concentration.

En définitive, nous avons abandonné cette méthode qui est par trop imprécise, et donne presque toujours des erreurs importantes par excès.

III - METHODE AU TETRAIODOPHENOL-PHTALEINE (tétraiode)⁽²¹⁾

La tétraiodophénol-phtaléine Sodique est un corps peu diffusible, d'après Delario⁽²²⁾, il ne semble pas être métabolisé par l'organisme.

Crismer⁽²³⁾ a trouvé 5 - 10 p. 100 éliminés par l'urine chez l'homme et des traces chez le chien.

Après une injection intraveineuse, la plus grande partie de ce produit reste dans le plasma et une petite quantité variant de 5 à 27 p. 100 se fixe sur les hématies. Il commence à apparaître dans la bile au bout d'une heure et demie.

Technique : Prélever d'abord un échantillon du sang et injecter par la voie intraveineuse $0,7 \text{ cm}^3$ de tétraiode par 10 kilogrammes de poids corporel ($1 \text{ cm}^3 = 90 \text{ mg. d'iode}$). Prélever au bout de 1, 3, 6, 10, 30 et 60 minutes des échantillons de sang. Centrifuger et doser l'iode dans le Sérum.

Mélanger 1 cm^3 de sérum avec 1 cm^3 d'une solution de KOH à 50 p. 100. Ce mélange repose pendant quelques heures dans une étuve à 100°C . Le mélange desséché est recouvert d'une pincée du mélange de sels suivants :

carbonate de sodium..... 1
nitrate de potassium..... 3
nitrate d'argent..... 1

Calciner le tout dans un creuset de quartz, dans un four à 400°C pendant 30 minutes. Après refroidissement on procède :

1 = à deux extractions par l'eau bouillante

2 = à une extraction à l'aide de 1 cc de SO_4H_2 8N additionnée de 3 gouttes d'une solution de sulfite de soude à 5 p. 100.

3 = à deux dernières extractions par l'eau bouillante.

La solution ainsi obtenue est amenée à un volume de 50 cm^3 , après refroidissement, elle est filtrée et la quantité d'iode contenue est dosée par une solution d'hyposulfite de sodium N/1000 en pré-

sence d'excès d'une solution d'iodure de potasse et d'une solution d'amidon soluble. (Ces deux solutions sont fraîchement préparées tous les deux jours et la solution d'hyposulfite est titrée avant chaque dosage).

On construit la courbe, on extrapole au temps zéro et on calcule le volume plasmatique d'après la formule : $V = \frac{Q}{C}$ dans laquelle Q représente la quantité du produit injectée en γ et C correspond à la concentration du produit en γ par cm^3 de sérum au moment de l'injection. Cette méthode n'a été utilisée jusqu'à lors que chez le chien.

Inconvénients

La méthode présente au point de vue de la diffusibilité du corps employé, les mêmes inconvénients que celles que nous venons de voir. On n'a même pas la ressource de recueillir l'urine pour y doser le colorant éliminé puisqu'il passe dans la bile. La disparition du colorant du sang est assez rapide, ce qui rend l'extrapolation plutôt incertaine.

Enfin, il est évident que la technique chimique de dosage est très longue et délicate. En contre-partie, elle ne semble pas apporter d'avantage quelconque.

IV - METHODE A LA SERUM ALBUMINE MARQUEE A L'IODE RADIOACTIF

C'est la seule et unique méthode qui puisse donner des résultats valables et précis. Nous nous réservons d'en donner le détail dans la troisième partie de ce travail.

MESURE DU VOLUME GLOBULAIRE V_G

Un grand nombre d'auteurs ont pris l'habitude d'évaluer le volume globulaire en grammes par kilogramme du poids. Cette notation plus homogène, présente néanmoins le défaut d'appeler "volume" un nombre de grammes par unité du poids corporel.

Pour ne pas compliquer les notations, nous appellerons volume globulaire le nombre de grammes, ou mieux de cm^3 de globules par kilogramme de poids. Ces deux notations se relient facilement l'une à l'autre; car, la densité des globules est constante et égale à 1,08.

I - METHODE AU FER RADIOACTIF $\text{Fe}^{59(24)}$

Technique : On injecte à un donneur universel, $\text{Rh}^{+ (*)}$ par voie intraveineuse, une solution neutre aqueuse de citrate de fer ammoniacal contenant un des deux isotopes radioactifs de fer; un millicurie (ou moins) de ce produit par injection intraveineuse n'a pas montré d'inconvénients dus à l'effet de la radiation sur l'organisme.

Les globules contenant du fer radioactif apparaissent dans le sang du donneur 24 heures après l'injection et la fixation atteint son niveau maximum au bout de 4 jours.

Une quantité du sang du donneur (100 cm^3), soigneusement mesurée, est injectée au receveur par la voie intraveineuse. Dix à vingt minutes après l'injection, on prélève au bras opposé des échantillons de sang, sans garrot, à 10-15 minutes d'intervalle sur l'héparine. Les échantillons sont centrifugés à 3000 tours par minute pendant 30 minutes. Leurs plasmas décantés et les culots globulaires

(*) Il est nécessaire de choisir des donneurs universels Rh^- pour les receveurs Rh^- .

sont réduits en cendres et leur fer précipité; la radioactivité est mesurée dans chaque échantillon.

Le sang du donneur présente, en général 40 ou 50 fois plus d'activité que celui du receveur. Le premier est dilué à 1/50 pour qu'ils présentent des radioactivités voisines. Les erreurs de comptage sont ainsi réduites. On en tire le volume globulaire.

Gibson et ses collaborateurs⁽²⁵⁾ ont trouvé chez 40 sujets un volume globulaire moyen de 29 cm^3 par kilogramme du poids corporel.

Avantages et inconvénients

La méthode de dosage avec le fer radioactif a le grand avantage de donner lieu à une rétention permanente de fer radioactif à l'intérieur des globules rouges, car le fer est lié à la porphyrine dans l'hémoglobine de ces derniers.

Les inconvénients de la méthode sont les suivants :

1.- Cette technique demande un sujet donneur avec un sang compatible avec celui du receveur.

2.- La quantité de sang employée est relativement grande (100 cm^3)

3.- les différents isotopes radioactifs du fer sont difficiles à produire au cyclotron ou à la pile atomique et des isotopes à longues périodes (Fe^{55} période 4 ans) sont d'ordinaire présents même dans les préparations les plus soigneusement obtenues. Or, l'isotope que l'on cherche à utiliser seul est le Fe^{59} , dont la période est de 47 jours.

4.- La méthode de détermination de la radioactivité dans les échantillons est compliquée et exige des manipulations physiques et chimiques.

5.- Enfin, si les observations faites permettent de penser que l'injection d'une telle quantité de radioisotope au donneur est sans danger grave, il est toutefois impossible d'affirmer que ce traitement est exempt de dangers ultérieurs possibles. On est donc en droit

d'estimer que l'emploi d'une telle méthode, sans nécessité thérapeutique, à l'occasion d'une simple épreuve biologique, engage lourdement la responsabilité du chef de laboratoire vis-à-vis du malade, et plus encore du donneur.

II - METHODE AU CHROME RADIOACTIF Cr^{51} (26)

Le chrome radioactif sous forme de $\text{CrO}_4 \text{Na}_2$ d'une période de 26,5 jours est un autre isotope radioactif qui peut servir à déterminer le volume globulaire total.

Technique : 50 cm^3 du sang du chien, héparinés sont mis en contact avec le chrome radioactif (7 à 26 μC)

Après une heure d'incubation, les globules rouges sont lavés avec du sérum physiologique ou du plasma sanguin et remis en suspension dans du plasma du même chien. Quatre cm^3 de cette suspension sont gardés pour servir de témoin et le reste est injecté dans la circulation. Après le temps nécessaire à la répartition des globules marqués dans le sang, des échantillons de 4 cm^3 sont prélevés à des intervalles bien définis.

Les échantillons des sangs prélevés, ainsi que celui du témoin sont centrifugés et les culots globulaires sont séchés à 60°C transformés en poudre fine et la radioactivité est mesurée.

Cette méthode donne un volume globulaire moyen de 32 cm^3 par kilogramme du poids.

Avantages et inconvénients

La technique au chrome radioactif partage avec la méthode au phosphore radioactif, l'avantage qu'un petit échantillon du sang du sujet peut être marqué rapidement in vitro et réinjecté. En outre, le chrome semble fixé plus énergiquement par les hématies que le phosphore et reste lié à ces dernières pour la période de 1 jour au

moins après l'injection. Après 3 jours, l'activité des globules diminue d'environ 15 p. 100, tandis qu'une chute semblable est observée au bout de 3 heures pour les globules rouges marqués au P^{32} .

Les inconvénients de la méthode sont la période assez longue de l'isotope, et la difficulté de la mesure de la radioactivité des échantillons, car le chrome radioactif émet des rayonnements gamma.

III - METHODE AU POTASSIUM RADIOACTIF K^{42} (27)

Le potassium radioactif sous forme de CO_3K d'une période de 12,4 heures est aussi un radioisotope qui sert à déterminer le volume globulaire ou le volume du sang total.

La méthode est semblable à celle du chrome radioactif, et donne des résultats identiques.

Technique : On met 10 cm^3 du sang du sujet en contact avec $200\text{ }\mu\text{c}$ de K^{42} pendant deux heures à un bain-marie à 37°C . On lave les globules trois fois avec une solution saline isotonique et on les remet en suspension dans cette dernière. On injecte approximativement 5 cm^3 de cette suspension contenant $2-4\text{ }\mu\text{c}$ de K^{42} . On mesure la radioactivité de la suspension de globules rouges injectée, à une dilution convenable, et celle des échantillons du sang total prélevé 10, 15 et 20 minutes après l'injection. On calcule alors le volume de sang total par comparaison de ces deux valeurs.

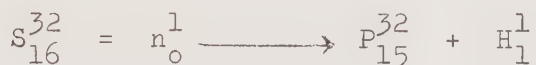
Avantages et inconvénients

Ils sont identiques à ceux de la méthode précédente. En outre, le potassium radioactif étant un isotope éphémère, il faut faire les mesures très rapidement, et on est obligé de faire des corrections, même si toutes les déterminations sont achevées dans la même journée.

T R O I S I E M E P A R T I E

LA METHODE AU PHOSPHORE RADIOACTIF

Le phosphore radioactif isotope P^{32}_{15} du phosphore peut s'obtenir à partir de P^{31}_{15} ou du soufre. La méthode la plus moderne est la production par la pile atomique. Le phosphore radioactif se produit par le bombardement, soit du phosphore rouge, soit du soufre.



Le radiophosphore destiné à l'usage biologique, est généralement fourni, soit sous forme d'acide orthophosphorique, soit sous forme de phosphate disodique. La quantité de matière correspondant au phosphore inactif est très faible, de l'ordre, au maximum, de 1 milligramme par millicurie. Le phosphore radioactif émet un rayonnement β d'une pénétration maximum approximative de 7 mm. dans les tissus; il est donc assez pénétrant et facile à compter avec un compteur Geiger-Muller ordinaire. La demi période de cet élément est de 14,3 jours et son produit de transformation est le soufre. Il présente, en outre, l'avantage de n'avoir pas de rayonnement γ . De plus, les phosphates sont des produits normaux de l'organisme et ne possèdent

donc, par eux-mêmes, aucune toxicité.

Tout cela fait de P^{32} un élément de choix pour une méthode biologique.

Le danger de rayonnement émis par les doses utilisées pour la détermination de la masse sanguine est nul. On injecte, en effet, pour une mesure, une quantité de P^{32} équivalent à 10 - 15 μ c. Une dose de 50 μ c correspond à une irradiation du sujet inférieure à 0,01 Roentgen, et la dose limite admise pour l'homme, dans le cas d'une exposition journalière répétée, est de 0,1 Roentgen.

Pour déterminer la masse sanguine, si on se contente d'injecter directement dans le sang le phosphore radioactif sous forme d'acide phosphorique marqué ou de phosphate, les inconvénients sont les mêmes que ceux qui ont été signalés précédemment, c'est-à-dire :

1.- Danger de voir la substance sortir de l'appareil circulatoire.

2.- Danger de voir la même substance se fixer sur les capillaires ou sur les parois des autres vaisseaux.

3.- Danger de voir la substance s'altérer dans le sang, ou même disparaître en partie.

4.- Danger de voir la substance se fixer électivement sur les éléments figurés du sang.

Si l'on emploie la méthode de marquage des hématies, on échappe à tous les inconvénients signalés, à condition qu'on soit sûr de voir le P^{32} rester fixé aux hématies pendant la durée de l'expérience. Il est facile de contrôler qu'il en est bien ainsi en effectuant plusieurs mesures pour voir s'il n'y a pas une décroissance progressive du taux de phosphore dans le sang.

Avant l'exposé de la technique faisant l'objet de cette thèse, nous croyons utile de rappeler très brièvement les différents procédés utilisés par les auteurs qui ont eu à s'occuper de cette question depuis 1940.

Le mérite des premiers travaux de détermination de la masse sanguine par le phosphore radioactif revient à Hahn et Hevesy⁽²⁸⁾.

Ceux-ci basent le principe de leur technique sur la dilution des globules marqués dans le sang. Ces corpuscules marqués sont obtenus par l'injection sous-cutanée chez un lapin donneur, d'une quantité de phosphate de sodium radioactif d'activité égale à environ 0,001 millicurie.

Au bout d'une semaine environ, les globules rouges du lapin donneur contiennent des phosphatides et des différents composés phosphorés acido-solubles marqués, comme les glycérophosphates et le triphosphate d'adénosine. Chacun de ces composés marqués peut être utilisé comme indicateur pour la détermination de degrés de la dilution des globules du lapin donneur dans la circulation du lapin receveur.

Technique : Du sang radioactif du lapin donneur est injecté dans la veine jugulaire d'un lapin receveur. Cinq minutes plus tard, on prélève du sang du lapin receveur sur héparine. Les phosphatides des globules sont extraits en totalité par la méthode de Bloor et leur phosphore est transformé en phosphate par incinération. On précipite le phosphore sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien; et l'activité du précipité est ensuite mesurée par un compteur de Geiger. Cette activité est comparée à celle du même précipité préparé à partir des globules du donneur.

On peut en même temps contrôler les résultats obtenus par le procédé qui emploie comme indicateur les composés phosphorés acido-solubles marqués. Après extraction des phosphatides, les globules sont extraits avec de l'acide trichloracétique à 10 p. 100. Le phosphore du filtrat est également transformé en phosphate ammoniaco-magnésien, et la même opération est faite sur les globules du lapin donneur.

Hahn et Hevesy ont trouvé, en ayant pris respectivement comme indicateur les phosphatides marqués et les composés phosphorés acido-solubles marqués, 46,4 et 45,4 cm³ de sang par kilogramme du poids

du lapin. Cette méthode appliquée au poussin, a donné 45 cm^3 par kilogramme du poids de poussins.

Ces auteurs ont trouvé que le taux de phosphatides marqués des globules du lapin receveur était resté au bout d'une heure à 90 p. 100 du taux trouvé au bout de 6 minutes (10 p. 100 de perte au bout d'une heure). Ce résultat prouve que la disparition des phosphatides marqués dans les globules se fait très lentement et que, par conséquent, on peut négliger la perte produite pendant l'intervalle qui sépare l'injection des globules marqués du lapin donneur dans la circulation du lapin receveur et le prélèvement d'échantillon de sang sur ce dernier.

Pour la disparition de molécules des composés phosphorés acido-solubles, Hahn et Hevesy ont trouvé que la disparition était plus rapide mais qu'elle n'affectait pas sensiblement les résultats (6 p.100 de perte au bout de 26 minutes).

En 1942, Brown, Hempelmann et Elman⁽²⁹⁾, reprenant la méthode précédente, l'ont simplifiée en mesurant la radioactivité des échantillons du sang de l'animal donneur et l'animal receveur directement au compteur de Geiger sans aucune manipulation chimique. Ils opèrent sur des chiens; ils trouvent que les globules du chien receveur conservent intacte leur radioactivité pendant plusieurs heures.

Les résultats trouvés par ces auteurs confirment ceux obtenus par Hahn et Hevesy.

Les valeurs de la masse sanguine obtenues par les globules marqués sont inférieures aux résultats trouvés par les déterminations simultanées avec un colorant.

L'incompatibilité de groupe sanguin entre l'animal donneur et receveur peut rendre l'épreuve sans valeur à cause de l'hémolyse.

Les deux procédés précédents nécessitent tous deux l'emploi d'un animal donneur pour fournir les globules contenant le phosphore radioactif en tant que phosphore organique.

Anderson⁽³⁰⁾, en 1942, a proposé pour la première fois l'utilisation de cellules mêmes de l'animal receveur, pour déterminer son propre volume globulaire et son propre volume sanguin.

On met quelques cm^3 du sang du sujet en contact avec le phosphate radioactif en présence d'oxalate de potassium comme anticoagulant. On met le mélange en incubation à 37°C en agitant toutes les 15 minutes. Au bout de trois heures environ, on centrifuge, on sépare le plasma, on lave les globules avec du soluté physiologique et on les met en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1000. On réinjecte un volume exactement mesuré de cette suspension à la veine de l'oreille du même lapin. Après 10 minutes la radioactivité d'1 cm^3 du sang retiré à l'oreille opposée est déterminée, après séchage à 100°C , sur un compteur de Geiger. Le volume sanguin s'obtient de la radioactivité totale injectée divisée par la radioactivité de 1 cm^3 du sang prélevé.

Cet auteur a trouvé un volume sanguin de $53\pm 4 \text{ cm}^3$ par kilogramme du poids du lapin.

La perte de la radioactivité par les globules dans le sang a été en même temps étudiée in vitro et in vivo. La perte in vitro est réellement minime. En ce qui concerne la perte de la radioactivité par les cellules in vivo, Anderson a trouvé une perte de 8 p. 100 dans les 20 minutes qui suivent l'injection des globules marqués, confirmant les mesures de Hahn et Hevesy.

En 1944, Hevesy, Koster, Sorensen, Warburg et Zerahn⁽³¹⁾, ont étudié le volume globulaire circulant chez l'homme.

Technique : On prend environ 25 cm^3 du sang par ponction veineuse sur héparine, on les mélange avec 1 microcurie de phosphate de sodium marqué, préalablement dilué dans 1 cm^3 de plasma du sujet. On place le tout dans un flacon enduit de paraffine et on l'agite doucement pendant deux heures dans une étuve à 37°C . Après ce laps de temps, on trouve que le P^{32} ajouté au sang est également distribué entre les globules et le plasma. Une toute petite partie du sang mar-

qué est gardée comme témoin, tandis que le reste est réinjecté dans la veine du sujet.

Connaissant la quantité des globules injectés A, le rapport de la radioactivité d'un gramme de globules du sang injecté à celle d'un gramme de globules retiré de la circulation, 5-10 minutes après l'injection B; la quantité totale des globules en circulation est donnée par :

$$X = A \times B$$

La quantité de globules injectée est obtenue à partir du volume de sang injecté, de la densité des globules (1,08) et de la valeur de l'hématocrite.

Hevesy et ses collaborateurs considèrent que cette méthode comporte trois principales causes d'erreurs :

1.- Les globules centrifugés (5.000 tours pendant 10 minutes) en vue des mesures, ne sont pas exempts de plasma, bien que la quantité de plasma adhérant à 1 gramme de globules de la préparation témoin puisse être supposée égale à la quantité de plasma adhérant à 1 gramme de globules prélevés, la séparation incomplète des globules et de plasma entraîne une erreur de 2,3 p. 100 par excès pour un prélèvement fait 3 minutes après l'injection et, de 3 p. 100 pour un prélèvement fait 10 minutes après.

2.- Comme on injecte du sang total radioactif, un peu de phosphore radioactif de plasma peut entrer dans les globules, pendant l'intervalle de temps qui sépare l'injection du sang marqué et la prise de l'échantillon, et augmente l'activité des globules, ce qui donne un volume globulaire plus petit.

L'erreur due à cet effet pour une expérience qui dure 10 minutes s'élève à 5 p. 100 par défaut.

3.- Pendant l'intervalle de temps qui sépare l'injection du sang actif et la prise d'échantillon du sang, un peu de P^{32} quitte les globules. Dans les expériences in vitro on a trouvé que 1,5 p. 100 du P^{32} contenu dans les globules a été remplacé par du phosphore inactif du plasma en 10 minutes, d'où une erreur de 1,5 p. 100 par excès.

Toutes ces corrections ayant été faites, ces auteurs ont trouvé un volume globulaire moyen de 36 grammes par kilogramme du poids corporel. En ajoutant au volume globulaire déterminé par la méthode au P^{32} le volume plasmatique déterminé par le colorant, ils ont obtenu le volume sanguin. Les taux ainsi trouvés sont indépendants de l'hématocrite. Les chiffres obtenus par cette méthode directe de détermination du volume sanguin sont inférieurs de 9 p. 100 environ aux chiffres obtenus à partir du volume plasmatique mesuré par le colorant et de l'hématocrite. Cet écart provient essentiellement de l'erreur, due à la confusion entre l'hématocrite somatique et l'hématocrite du sang veineux périphérique, comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus.

En 1945, Nylin⁽³²⁾ a appliqué la méthode précédente dans certains cas pathologiques, en particulier dans les dilatations cardiaques où, au moyen des prélèvements répétés de sang artériel, il a établi des courbes de dilutions des globules marqués dans le sang; c'est-à-dire des courbes qui indiquent la manière dont les globules se répartissent dans la circulation entre le moment de l'injection et le moment où la répartition est uniforme. Il a prouvé que la quantité de sang résiduelle, qui reste dans le coeur à la fin de la systole, influence grandement l'allure de cette courbe. Nylin a mesuré le V_G circulant par la méthode de Hevesy et à partir du V_G et l'hématocrite, il a calculé le V_p et, le volume sanguin est obtenu de la somme de ces deux valeurs.

Pour six cas normaux, la répartition des globules marqués, injectés dans le sang, est devenue uniforme avant la 3ème minute après l'injection. La quantité moyenne des globules est de 33,4 grammes

par kilogramme et le volume sanguin $71,8 \text{ cm}^3/\text{kg}$.

Chez six malades à cardiopathie compensée, la répartition est devenue uniforme plus lentement que les cas précédents; ceci correspond à l'allure de la courbe de la dilution et aux volumes cardiaques importants des malades. La quantité moyenne de leurs globules est de $31,8$ grammes par kilogramme du poids, et le volume moyen du sang est de $71,8 \text{ cm}^3$ par kilogramme.

Nylin⁽³³⁾ par cette méthode a mesuré le volume du sang circulant d'un poumon chez trois malades, pendant la pneumonectomie, et le volume du sang circulant des membres inférieurs; ainsi le volume sanguin d'un poumon est de 17 p. 100 et celui des membres inférieurs de 13,6 p. 100 du volume sanguin total du corps.

En 1948, Kelly, Simonsen et Elman⁽³⁴⁾ ont repris le travail de Nylin en modifiant la technique : pour mesurer la radioactivité du sang, les globules sont hémolysés dans l'eau distillée pure, et la radioactivité de cette solution est étudiée. Pour les autres points (injection, temps de prélèvement des échantillons) ils opèrent comme Hevesy. Ces auteurs signalent les mêmes principales causes d'erreurs que Hevesy et ses collaborateurs, et leurs résultats confirment ceux de ces derniers.

En 1949, la méthode a connu un perfectionnement très sensible grâce aux travaux de Reeve et Veall⁽³⁵⁾. Ces auteurs ont injecté au sujet des globules rouges marqués au P^{32} , débarrassés de leur plasma radioactif par lavages. Ainsi, ils ont supprimé la deuxième principale cause d'erreur citée par Hevesy et ses collaborateurs, due à la pénétration du P^{32} du plasma de sang injecté dans les globules non marqués du sujet. En outre, en supprimant l'injection du plasma radioactif on injectera au sujet moins de radioélément, bien que les risques dus aux radiations soient négligeables dans ces expériences.

Technique : $10-15 \text{ cm}^3$ du sang hépariné du sujet sont mis à l'étuve à 37°C pendant 1 heure avec $7 \mu\text{c}$ de P^{32} dans un tube à centri-

fuger. Les globules radioactifs contenant à peu près 2 μ c du P^{32} sont débarrassés, au bout d'1 heure, de leur plasma radioactif, lavés trois fois avec du sérum physiologique glacé et mis en suspension dans ce dernier. 10 cm^3 de cette suspension sont injectés au sujet et des échantillons de sang total prélevés à intervalles réguliers. Les échantillons de sang total prélevés et une petite quantité de la suspension des globules injectés, qui doit servir de témoin, sont dilués dans un mélange de phosphate-citrate et les globules rouges sont hémolysés par la saponine. Tous les échantillons sont dilués de façon qu'ils présentent des radioactivités voisines, afin de réduire les erreurs de comptage.

$$\text{Le volume globulaire} = A \frac{h}{n}$$

A = la quantité totale de radioactivité dans les globules rouges injectés.

n = la radioactivité de 1 cm^3 du sang total prélevé après l'injection, corrigée pour la perte de P^{32} par les globules marqués pendant l'expérience (6-7 p. 100 pendant 1 heure).

h = l'hématocrite veineux de 1 cm^3 du sang prélevé corrigé pour le plasma emprisonné par les globules.

Des dosages du taux de P^{32} contenu dans du soluté physiologique qui surnage les globules marqués ont montré seulement 1/100 du taux, présent dans les globules.

Ces auteurs prennent de très nombreuses précautions pour les mesures des échantillons, afin de ne pas introduire d'erreurs systématiques. Nous reviendrons en détail sur cette technique lorsque nous décrirons la nôtre.

Reeve et Veall sont les premiers à avoir fait de la méthode au P^{32} une méthode réellement précise de mesure de la masse sanguine.

Le volume globulaire trouvé par ces chercheurs est de 30 cm^3 par kilogramme du poids corporel. Ces mêmes auteurs ont mesuré et calculé le volume globulaire indirectement par le volume plasmatique,

mesuré par le colorant T₁₈₂₄, et l'hématocrite.

La valeur déterminée par la méthode au P³² était inférieure à celle obtenue par le colorant et indiquait le rapport :

$$\frac{V_G \text{ par le } P^{32}}{V_G \text{ par le } T_{1824}} = 0,87$$

Un peu plus tard (1950) Nachman, James, Moore et Evans⁽³⁶⁾ en employant la méthode décrite par Reeve et Veall pour mesurer le V_G ont étudié en même temps le volume plasmatique par le colorant bleu T₁₈₂₄ et calculé le volume globulaire indirectement à partir de cette valeur et le résultat de l'hématocrite. Leurs résultats confirment sensiblement ceux obtenus par Reeve et Veall.

Dans leur méthode au P³², pour mesurer la radioactivité des échantillons de sang, ils ont employé une solution de carbonate de sodium à 0,1 p. 100 pour hémolyser les globules rouges en les diluant à moitié de volume dans cette solution. La suspension des globules marqués est diluée au 1/100 par la même solution afin de présenter la même radioactivité que les échantillons prélevés.

Berson et Yalou⁽³⁷⁾ en 1952 ont mesuré le volume sanguin total par la méthode d'hématies marqués au P³², et le volume plasmatique total par l'albumine humaine marquée à l'iode radioactif (I¹³¹). Le marquage, le lavage et la mise en suspension des globules marqués sont faits exactement de la façon décrite par Reeve et Veall. Les solutions injectées sont de poids connus et leurs volumes sont calculés à partir du poids et de la densité.

Après avoir pris des échantillons de sang prélevés au bras opposé sur héparine, on injecte une solution de 100 µc d'albumine marquée dans 5 cm³ de solution saline isotonique. On prélève du sang de la même façon aux mêmes intervalles de temps.

En utilisant un compteur à rayons γ, entouré d'une mince couche de plomb, l'iode radioactif peut être mesuré en présence de phosphore

radioactif.

Ces auteurs ont montré que le mélange des hématies marquées et de l'albumine marquée dans le sang total est complet à 10 p. 100 près au bout des 60 à 90 secondes après l'injection, à moins que la circulation ne soit entravée par une défaillance cardiaque. La perte de l'activité, dans la circulation de l'une ou l'autre de ces substances marquées est de l'ordre de 1 p. 100 au moins par 15 minutes pendant les premières heures.

Volume sanguin, volume globulaire et volume plasmatique sont obtenus alors par les formules suivantes :

$$V_S = \frac{\text{Radioactivité totale injectée (P}^{32} \text{ ou I}^{131})}{\text{Radioactivité de 1cm}^3 \text{ du sang total prélevé}}$$

$$V_G = V_S \quad (\text{hématies marquées au P}^{32}) \quad \times \quad h \quad \times \quad 0,98$$

$$V_P = V_S \quad (\text{albumine I}^{131}) \quad \times \quad (1 - h \times 0,98)$$

Ces chercheurs qui effectuent leurs mesures de radioactivité sur du sang total, ont ainsi mesuré la masse sanguine par P^{32} et I^{131} . Comme le P^{32} marque les hématies, ils utilisent le volume sanguin calculé par cet isotope, en vue de déterminer le volume globulaire, grâce à l'hématocrite. Ils opèrent parallèlement sur le volume sanguin obtenu par I^{131} pour mesurer le volume plasmatique.

Le volume sanguin par P^{32} est toujours inférieur au volume sanguin par I^{131} .

La bonne valeur de la masse sanguine, de l'avis de ces auteurs, est obtenue en ajoutant V_G et V_P calculés comme nous l'avons indiqué ci-dessus. Cette valeur est intermédiaire entre la valeur au P^{32} et la valeur au I^{131} .

Il est certain que la mesure de la masse sanguine par globules marqués détermine en réalité le volume globulaire, et la masse du sang est calculée en ayant recours à l'hématocrite. Nous avons souligné les erreurs que cela entraînait. De la même manière, une mé-

thode à l'albumine marquée permet de calculer avec précision le volume plasmatique, et conserve les mêmes inconvénients pour une détermination de la masse sanguine.

On ne saurait donc faire mieux en théorie que Berson et Yalou, c'est-à-dire que de mesurer la masse globulaire par P^{32} , et la masse plasmatique par l'albumine marquée, et d'ajouter ces deux nombres pour calculer la masse sanguine. La difficulté la plus grande de cette méthode, en clinique, est la manipulation de la sérum-albumine marquée par l'iode, qui libère constamment cet élément et qui doit-être dialysée juste avant l'injection. Il est facile d'imaginer les complications opératoires que cela entraîne, surtout si l'on doit opérer aseptiquement.

Berson, Yalou, Azulay, Schreiber et Roswit⁽³⁸⁾ ont étudié la décroissance de l'activité des globules marqués après injection.

La technique est celle de Reeve et Veall : douze minutes après l'injection des globules marqués, on prélève du sang à des intervalles bien définis. Les prélèvements sont répétés jusqu'à ce que la radioactivité de l'échantillon tombe à zéro. Sur un papier semi-logarithmique on porte en ordonnée les radioactivités observées et en abscisse les temps de prélèvement; on obtient ainsi une droite. Chez 18 sujets étudiés, la radioactivité des globules rouges tombés à zéro, met en évidence une demi vie de 12 à 39 heures. La radioactivité théorique du sang peut donc être calculée à n'importe quel moment par l'extrapolation à partir de cette ligne.

Les volumes initiaux des globules rouges, du sang total et du plasma sont calculés comme nous l'avons indiqué plus haut. Ces auteurs ont étudié des fluctuations et des changements brusques du volume sanguin dans des conditions cliniques expérimentales précises. Ils ont augmenté la masse sanguine par l'injection intraveineuse de sérum physiologique et de solution de sérum-albumine. Ils l'ont diminuée dans d'autres cas par hémorragie ou en provoquant une forte diurèse par les composés mercuriels ou par la digitaline chez les

cardiaques.

Dans les deux cas, la radioactivité d'un échantillon de sang est étudiée et les nouveaux volumes sont calculés de la façon suivante :

$$V_S \text{ (nouveau)} = V_S \text{ (initial)} \times \frac{\text{Radioactivité théorique}}{\text{Radioactivité mesurée}}$$

$$V_G \text{ (nouveau)} = V_S \text{ (nouveau)} \times \text{hématocrite (nouveau)}$$

$$V_P \text{ (nouveau)} = V_S \text{ (nouveau)} - V_G \text{ (nouveau)}$$

La méthode de détermination du volume globulaire par le P^{32} a été légèrement modifiée par Chaplin⁽³⁹⁾ en 1954.

Cet auteur trouve que la perte de 1 p. 100 de P^{32} dans le liquide de suspension des globules lavés, trouvé par Reeve et Veall, dépasse largement la limite théorique en vue d'une bonne mesure. Il estime qu'il ne faut pas dépasser 0,2 p. 100 dans la première heure qui suit la fin du lavage, à une température de + 4°C. Il mentionne que les globules rouges abandonnent au moins quatre fois plus de radiophosphore s'ils sont totalement séparés de leur plasma. Il a montré l'action protectrice marquée exercée par la présence d'une quantité, même infime de plasma dans le milieu de suspension, qui réduit la perte de P^{32} par les globules dans le soluté physiologique surnageant à 0,1-0,4 p. 100.

Ce chercheur conseille alors d'ajouter au soluté salin froid servant à laver les globules marqués au P^{32} , 3 p. 100 de leur propre plasma hépariné.

En France, Hartmann, Loverdo et Fauvert⁽⁴⁰⁾, en 1955, ont publié un rapport concernant la mesure du volume sanguin total par les techniques des hématies marquées au P^{32} et au Cr^{51} dans 171 cas. Ils ont jumelé la méthode avec celle au colorant permettant une étude comparative.

Ces chercheurs marquent et lavent leurs globules comme faisaient

Reeve et Veall et ils injectent en même temps que le colorant, un volume connu d'une suspension de globules marqués au P^{32} . Les prélèvements du sang sont faits 10 - 15 - 20 minutes après l'injection. 1 cm³ de sang total de chaque prélèvement est desséché, la radioactivité de chacun, mesurée au compteur de Geiger et comparée à celle d'un échantillon témoin.

Pour préparer l'échantillon témoin, ces auteurs hémolysent 1 cm³ de la suspension initiale dans 500 cm³ d'eau bidistillée. L'échantillon témoin séché correspond à un centimètre tube de cette solution, son activité spécifique est de l'ordre de grandeur de celle des échantillons sanguins prélevés chez le sujet.

L'activité totale injectée correspond à l'activité spécifique de l'échantillon témoin multiplié par 10 et par 500. Ces auteurs ont appliqué deux coefficients de correction : l'un correspond à la perte à l'injection: 0,97 (3 p. 100 de la radioactivité restée dans le seringue), l'autre aux phénomènes d'auto-absorption du rayonnement bêta dans les échantillons: 0,875.

Dans 171 cas, ces chercheurs, en jumelant les techniques du bleu d'Evans et des hématies marquées, ont trouvé un rapport statistique de $1,09 \pm 0,15$ entre le volume sanguin total mesuré au bleu d'Evans et celui mesuré aux hématies marquées.

$$\frac{V_{S. \text{ bleu d'Evans}}}{V_{S. \text{ hématies marquées}}} = 1,09 \pm 0,15$$

La valeur moyenne de volume sanguin est de $(7,9 \pm 1,2)$ p. 100 du poids théorique du corps.

Q U A T R I E M E P A R T I E

TECHNIQUE DE MESURE DE LA MASSE SANGUINE

PAR LE RADIOPHOSPHORE P^{32}

Après avoir passé en revue dans la partie précédente les travaux des différents auteurs qui ont travaillé avec le phosphore radioactif, nous allons maintenant exposer en détail notre méthode.

Elle dérive évidemment de celles que nous venons d'étudier, mais nous avons, dans une certaine mesure, essayé d'en augmenter la précision. Pour chaque phase nous donnerons, en dehors des détails qui nous sont propres, les raisons pour lesquelles nous avons choisi d'opérer ainsi. Ces prévisions, souvent déduites des travaux antérieurs, n'avaient pas leur place dans l'exposé général de la troisième partie, et la trouveront tout naturellement ici.

En bref, notre technique se résume ainsi :

On verse 10-20 cm³ du sang prélevé sur le sujet par ponction veineuse à la veine du pli du coude, dans un tube à centrifuger, stérile, contenant de l'orthophosphate alcalin marqué par le radiophosphore (25-30 μ c) et de l'héparine (10 mg).

Après mélange parfait, le tout est laissé en contact pendant deux heures au bain-marie à 37°C. Après ce laps de temps, on sépare

par centrifugation les hématies marquées de leur plasma radioactif; on les lave trois fois avec du soluté physiologique glacé stérile et on les met en suspension dans le même soluté neuf.

Un poids connu de cette suspension est injecté au sujet et une petite quantité est conservée pour servir de témoin. 5min. 10min. 15min. 20min. après l'injection, on prélève à la veine du bras opposé, des échantillons de sang sur de l'héparine sèche. La radioactivité par gramme de la suspension témoin et des échantillons du sang prélevé, est mesurée à l'aide d'un compteur de Geiger-Muller.

De la comparaison des deux dosages radioactifs, on déduit le volume de la masse sanguine pratique.

Cette technique comporte six temps essentiels que nous allons maintenant étudier en détail ;

A - PREPARATION DES SOLUTIONS DE P^{32}

Nos solutions mères venaient d'Angleterre (A.E.R.F., Harwell, Berkshire). On dilue cette solution dès sa réception dans du sérum physiologique isotonique, de façon à obtenir une solution diluée contenant 50 uc par cm^3 environ.

La verrerie qui avait contenu des solutions ou du sang radioactifs était mise à tremper dans une solution acide ($C\dot{H}$ N environ) pendant 24 heures, puis abondamment rincée. On trouve ainsi qu'elle ne retient pas de P^{32} en quantité mesurable. Les aiguilles et les petits instruments métalliques, en général, étaient traités de la même manière, mais on remplaçait l'acide chlorhydrique par l'acide citrique. Il est important de faire ces lavages de décontamination aussi vite que possible après l'emploi du matériel, pour éviter une pénétration en profondeur du P^{32} dans le métal ou le verre.

Dans deux tubes à centrifuger cylindriques, munis de capsule à vis, on introduit 0,50 cm^3 (25 μc de P^{32} environ) de la solution fraîchement diluée et 10 mg. d'héparine. On bouche les tubes et on les

stérilise à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Si la solution est vieille, le taux de P^{32} est forcément abaissé, dans ce cas, connaissant la radioactivité initiale et le nombre de jours écoulés, on calcule facilement le taux de radioactivité actuelle d'après la formule suivante:

$$\log_{10} QT = \log_{10} Q_0 - (0,02105 n)$$

dans laquelle :

QT = la radioactivité actuelle

Q_0 = " " initiale

n = nombre de jours écoulés

Il faut, par conséquent, que les bouteilles contenant les solutions mères soient bien bouchées avec une étiquette indiquant la radioactivité à une date précise. Dans ces conditions, il est facile de calculer immédiatement la radioactivité d'une solution même vieillie.

Il est évidemment préférable, si on en a la possibilité, de se procurer auprès d'un laboratoire du Haut Commissariat à l'Energie Atomique un échantillon étalon de P^{32} permettant de contrôler l'activité réelle de la solution qu'on va utiliser.

Cette solution stérile à 50 μc par cm^3 sera utilisée pour le marquage des globules. Le tube à centrifuger qui contient 25 μc en tout sera directement utilisé pour cette opération.

B - PREPARATION ET LAVAGE DES GLOBULES ROUGES MARQUES

Tout d'abord, Hevesy préparait les globules marqués au P^{32} in vivo en injectant, par voie sous cutanée à un lapin donneur, du phosphate disodique marqué au P^{32} .

Peu de temps après, Anderson, et ensuite Hevesy et ses collaborateurs, ont conseillé l'utilisation des propres globules du sujet

en mettant son sang en contact avec une solution de phosphate disodique marquée au P^{32} pendant deux heures, mais comme ils injectaient le sang total marqué, cela entraînait différentes causes d'erreurs dues à l'injection du plasma radioactif, que nous avons décrites en page 48.

Reeve et Weall ont proposé pour la première fois (1949) l'utilisation des globules seuls du sujet marqués, puis lavés.

Tous ceux qui ont utilisé le sang radioactif ont mis le sang en contact avec le P^{32} pendant deux heures, ce qui se rapproche du temps minimum le plus satisfaisant; car plus le temps d'incubation est court, plus grande est la proportion de P^{32} restée dans le plasma et donc plus grandes seront les erreurs provoquées par la présence du plasma radioactif dans l'échantillon à injecter.

Un avantage de la méthode de lavage des globules marqués, est qu'on peut disposer d'un temps d'incubation beaucoup plus court et la portion restée dans le plasma, grande ou petite, n'est pas gênante. Un autre avantage est dû à l'absence des erreurs entraînées par l'injection du plasma radioactif.

Nous avons choisi le mode opératoire suivant :

On prélève 10-20 cm³ du sang du sujet dans une seringue stérile et sèche; le sang est ensuite doucement versé dans le tube contenant le phosphore radioactif et l'héparine; on prend le soin de passer à la flamme l'ouverture du tube, après l'ouverture et avant la fermeture; on bouche; on mélange bien le contenu et on le place au bain-marie à 37°C pendant deux heures en l'agitant tous les quarts d'heure.

30 p. 100 environ du P^{32} pénètrent dans les hématies pendant la première heure et encore 20 p. 100 pendant la deuxième heure.

Au bout de deux heures, le mélange est retiré du bain-marie et centrifugé à 2.500 tours par minute pendant cinq minutes. Nous insistons sur le fait que le sang et les globules doivent être manipulés avec délicatesse. Tout phénomène qui pourrait provoquer une hémolyse ou l'écrasement des globules, (centrifugation longue et accélérée, agitation brutale du tube, etc...) doit être évité.

On débouche le tube; on flambe l'ouverture, et à l'aide d'une pipette à boule stérile passée à la flamme et munie d'un tube de caoutchouc de 25 cm de longueur, on aspire le plasma radioactif surnageant, et on le remplace par son volume du soluté physiologique glacé stérile, on reflambe l'ouverture du tube et après l'avoir bien bouché on remet lentement les hématies en suspension. On centrifuge de nouveau pendant cinq minutes et on répète le lavage deux fois, et à chaque fois les globules sédimentés sont remis en suspension dans le soluté physiologique glacé stérile.

Toutes ces opérations sont conduites aseptiquement. On prend en particulier, toujours soin de passer à la flamme les ouvertures du tube contenant les globules et la bouteille du soluté physiologique après chaque ouverture, et avant chaque fermeture.

A la fin du troisième lavage, on ajoute du soluté physiologique stérile jusqu'au volume initial du sang, et sans remettre les globules en suspension, on place le tube dans un bain glacé jusqu'au moment de l'injection.

On doit limiter l'intervalle de temps entre le dernier lavage et l'injection de la suspension à 15-20 minutes.

A + 4°C le phosphore radioactif fixé par les globules rouges ne passe dans le liquide de suspension que pour une très faible part; 1 p. 100 du taux contenu dans les globules d'après Reeve et Veall. Nous avons fait cette détermination et avons trouvé 0,95 p. 100.

C - INJECTION DES GLOBULES MARQUES ET PRELEVEMENT

On retire le tube du bain de glace et on le remue doucement et suffisamment, de façon que toutes les hématies se trouvent en suspension.

On débouche le tube, on flambe l'ouverture et on aspire 10 à 15 cm³ de la suspension à l'aide d'une seringue de 20 cm³ stérile et sèche, munie d'une longue aiguille, qui puisse arriver jusqu'au

fond du tube. On rebouche le tube et on conserve le reste de la suspension pour servir de témoin.

La seringue ainsi remplie est détachée de l'aiguille et pesée par double pesée.

$$\text{Tare} = \text{Seringue pleine} + p_1$$

On injecte au sujet dans la veine du pli du coude 1 cm^3 de solution d'héparine (50 mg.), on retire la seringue sans enlever l'aiguille et on injecte la suspension des globules marqués. On déclanche le chronomètre au moment où environ la moitié de la suspension est injectée.

Il faut prendre soin de s'abstenir d'aspirer et réinjecter du sang par cette seringue. On retire l'ensemble de l'aiguille et la seringue, et cette dernière est pesée de nouveau, telle quelle :

$$\text{Tare} = \text{Seringue vide} + p_2$$

Il est évident que $p_2 - p_1$ représentent le poids exact de la suspension des globules marqués injectée.

Nous avons choisi de peser la seringue avant et après l'injection parce qu'il est très important que la quantité de suspension radioactive injectée soit connue avec une bonne précision. Nous pensons qu'en tous cas, il ne faut jamais se fier à la graduation d'une seringue pour apprécier la quantité injectée. Les erreurs pourraient être de 10 à 20 p. 100.

Trois minutes après l'injection, on introduit une aiguille à demeure (1,5 mm. de diamètre) munie d'un mandrin, dans la veine du pli du coude du bras opposé (pour éviter les contaminations), et on enlève le garrot pour éviter toute stase au moment des prélèvements; on peut ainsi faire les prélèvements successifs en laissant l'aiguille en place, sans qu'il y ait de risque de coagulation.

5, 10, 15 et 20 minutes après l'injection, on retire le mandrin,

on laisse couler les premières gouttes du sang sur un morceau de coton hydrophile que l'on jette, et ensuite on recueille à chaque fois du sang (2 à 3 cm³) dans des tubes contenant de l'héparine sèche. L'écoulement dure 10-12 secondes environ, pour chaque échantillon.

Il est indispensable que le sang coule dans les tubes aisément, sans qu'il y ait besoin qu'on accélère l'écoulement par des massages du bras ou l'application d'un garrot. Nous avons observé, au cours de nos expériences, que quand le sang ne coulait pas facilement à cause d'une coagulation, l'échantillon montrait une radioactivité considérablement supérieure à celle qu'il devait présenter. Une pareille ascension du chiffre obtenu est également observée à la suite d'une application du garrot.

C'est pour éviter ces erreurs que nous avons pris la précaution d'injecter préalablement au malade de l'héparine. La quantité prescrite plus haut évite la coagulation seulement pendant 30 minutes; temps nécessaire pour effectuer un échantillonnage correct.

D - PREPARATION DE LA SUSPENSION TEMOIN ET DES ECHANTILLONS POUR LA MESURE

Tout au début, Hahn et Hevesy (1940), effectuaient le dosage de la radioactivité sur un précipité de phosphate ammoniaco-magnésien produit à partir d'un volume connu de globules radioactifs; tandis que Anderson mesurait la radioactivité des échantillons sur un volume déterminé du sang après séchage à 100°C.

Hevesy et ses collaborateurs en 1944, basaient leur dosage de la radioactivité sur celle de 1 gramme de globules sans les peser directement, mais en calculant leur masse à partir du volume du sang, au moyen de l'hématocrite et connaissant la densité des globules.

Kelly, Simonsen et Elman (1948), centrifugeaient à grande vitesse un volume connu de sang de façon à le séparer totalement de son

plasma et remplaçaient soigneusement ce dernier par de l'eau distillée afin d'hémolyser les hématies. La radioactivité de 1 cm^3 d'hémolysat séché est égale à celle de 1 cm^3 du sang total.

Nachman et ses collaborateurs (1950) séparaient les hématies de leur plasma et les diluaient à parties égales avec une solution de carbonate de sodium à 0,1 p. 100, tandis que pour la suspension témoin, ils faisaient une dilution de 1/100. Un volume déterminé de chaque hémolysat est ensuite séché sur une plaque de cuivre et ils mesuraient leur radioactivité avec un compteur.

Reeve et Veall en 1949, préparaient, pour les échantillons prélevés après l'injection, une dilution de 5 cm^3 du sang dans 7 cm^3 d'une solution tampon de phosphate-citrate. Les globules étaient lysés par addition d'une petite quantité de saponine; la solution ainsi obtenue était ensuite versée dans un compteur à liquide et sa radioactivité était mesurée.

Pour leur suspension témoin, ils préparaient d'abord une dilution à 1/50, et ensuite ils prenaient 1 cm^3 de cette dilution, 5 cm^3 du sang non actif du malade et 6 cm^3 de la solution tampon; cette dilution présentait presque la même radioactivité que les échantillons du sang prélevé.

Hartmann, Loverdo et Fauvert (1955) mesuraient exactement 1 cm^3 de sang total prélevé, et 1 cm^3 d'une dilution au 1/500 de la suspension initiale de globules marqués dans de l'eau bidistillée. La dessiccation des échantillons était assurée par un séjour à l'étuve à 37°C pendant 24 heures, et leur radioactivité était mesurée au compteur de Geiger.

Toutes ces techniques n'étant pas à l'abri de critiques, surtout à cause du manque de précision des mesures de volume de sang, quand on doit le diluer à un taux élevé, nous avons adopté le mode opératoire suivant :

PREPARATION DE LA DILUTION DE LA SUSPENSION TEMOIN

Les préparations trop actives sont non seulement nuisibles pour le compteur, mais en outre, on n'obtient pas avec de telles préparations des mesures correctes, car le compteur ne peut plus, au-dessus d'un certain chiffre, compter tous les rayons β émis, sans en oublier une certaine proportion, à cause de sa constante de temps.

La suspension des globules radioactifs injectés ayant une radioactivité trop élevée, demande à être diluée en vue d'une mesure précise.

Nous avons essayé, au cours de 18 expériences, de diluer la suspension initiale dans le soluté physiologique isotonique, en prenant grand soin de mettre les hématies en suspension d'une façon uniforme, malgré la grande difficulté technique que cela présentait, car les globules ont tendance à sédimenter très vite dans un milieu peu visqueux.

A cet effet, on pèse, par double pesée, dans un tube bouché à l'émeri, 2 ou 3 gouttes de la suspension initiale qu'on dilue dans une quantité pesée de soluté physiologique.

$$\text{Tare} = \text{tube} + A$$

$$\text{Tare} = \text{tube} + \text{sang} + B$$

$$\text{Tare} = \text{tube} + \text{sang} + \text{soluté physiologique} + C$$

$$A - B = \text{poids de sang}$$

$$A - C = \text{poids de la dilution}$$

$$\frac{A - B}{A - C} = \text{taux de dilution en poids.}$$

Ce taux de dilution doit être voisin de $\frac{1}{50}$ compris en tout cas entre $\frac{1}{20}$ et $\frac{1}{70}$.

Pour le reste de nos expériences, nous avons dilué la suspension initiale dans le sang du malade lui-même à des taux voisins à ceux cités et ensuite à des taux compris entre $\frac{1}{300}$ et $\frac{1}{400}$. Nous discuterons les résultats obtenus avec ces variantes plus loin.

PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES MESURES

On prend un morceau de feuille d'aluminium rectangulaire qui a pour dimension : longueur 5,8 cm, largeur 1,3 cm, épaisseur 1/20 mm. On plie les bords de façon à former une coupelle, au fond de laquelle on mettra un morceau de papier filtre de la même dimension que le fond de la coupelle : $4,9 \text{ cm}^2$. On en prépare sept, dont quatre serviront pour les échantillons prélevés à 5, 10, 15 et 20 minutes après l'injection et trois autres pour les échantillons témoins.

Avec une balance de précision à 1/2 milligramme on pèse chaque coupelle vide par double pesée, par exemple :

$$\text{Tare} = \text{Coupelle} + 1,848$$

On prend alors le tube de l'échantillon de sang prélevé au bout de 5 minutes, on l'agite bien, afin que tous les globules sédimentés se remettent en suspension de façon homogène. Avec une pipette sèche on aspire une petite quantité du sang et on en dépose 2 ou 3 gouttes sur le papier filtre qui demeure au fond de la coupelle; on reporte la coupelle sur la balance :

$$\text{Tare} = \text{Coupelle} + \text{sang} + 1,736.$$

Le poids du sang pesé est donc :

$$1,848 - 1,736 = 0,112 \text{ grammes}$$

On pèse ainsi 2 ou 3 gouttes de chaque prélèvement dans une coupelle, en prenant soin d'utiliser à chaque fois une pipette propre et sèche.

Il est très important de noter le poids aussitôt qu'on a déposé les gouttes de sang sur le papier filtre, car la surface d'évaporation étant très grande, le poids d'échantillon diminue très vite à cause de la rapidité de l'évaporation.

Les coupelles contenant les papiers filtres imprégnés de sangs radioactifs pesés sont placées par ordre dans des cases indiquant les références : E_5 E_{10} E_{15} E_{20} qui correspondent aux échantillons prélevés au bout de 5, 10, 15, 20 minutes après l'injection.

Les trois autres coupelles seront préparées et pesées de la même façon, en utilisant cette fois la suspension initiale diluée que nous venons de décrire plus haut. Elles portent les références : T_1 , T_2 , T_3 .

On laisse sécher les sept échantillons à la température du laboratoire, ou bien dans une étuve à 37°C . Au bout de 24 heures, les papiers filtres imprégnés du sang et de la dilution témoin, sont complètement secs.

On prépare alors sept morceaux de carton rectangulaires de dimension : longueur 7 cm, largeur 5 cm; on met la coupelle exactement au milieu du rectangle, et à l'aide d'une bande de cellophane adhésive, plus large que la coupelle, on la fixe sur le carton en aplanissant les bords de la coupelle. Elle reprend ainsi la forme plane de la feuille de l'aluminium qui a servi à la fabriquer. On prend soin que toute la surface de la feuille métallique au milieu de laquelle demeure toujours le papier filtre portant le sang desséché, soit recouverte de cellophane.

Au verso de chaque carton, les références de chaque échantillon, la date de l'expérience et le nom du sujet sont inscrits pour éviter toute erreur.

Les échantillons ainsi préparés sont prêts à passer au compteur de Geiger-Muller pour que leur radioactivité soit mesurée.

E - MESURE DE LA RADIOACTIVITE

Un même échantillon radioactif donne au compteur des mesures différentes s'il est mesuré à différents voltages.

Pour déterminer le voltage le plus favorable aux mesures, on détermine la radioactivité d'un même échantillon avec les voltages qui varient de 1000 à 1500 volts par exemple.

On porte en ordonnée le nombre de coups par minute et en abscisse le voltage avec lequel la mesure est faite. La courbe ainsi obtenue monte progressivement à partir de 1050 volts jusqu'à 1150 et forme à ce moment-là un palier de 1150 à 1200 volts; elle remonte ensuite progressivement jusqu'à 1400 volts. Le voltage indiqué pour les mesures est établi au milieu de ce palier, c'est-à-dire à 1175 volts.

Chaque compteur, sans qu'un élément radioactif lui soit présenté, donne un certain nombre de coups par minute dus essentiellement aux rayonnements cosmiques. Ce mouvement propre doit être déterminé à chaque expérience et retranché de la radioactivité de l'échantillon à étudier. Pour déterminer le mouvement propre du compteur, on met celui-ci en marche en même temps qu'un chronomètre, jusqu'au moment où le nombre de coups totalisés est voisin de 300. A ce moment, on arrête en même temps le compteur et le chronomètre, et on calcule le nombre de coups par minute; il représente le mouvement propre du compteur à l'instant considéré. La détermination doit être faite à l'abri de la lumière, et dans les mêmes conditions que les mesures.

Nous avons à notre disposition un compteur provenant de l'Energie Atomique, avec une échelle de 100. Nous avons mesuré avant chaque expérience le mouvement propre du compteur, et nos lectures ont toujours été effectuées à 2000 volts.

Les échantillons de sang ainsi que ceux de la dilution témoin, qu'on a préparés et collés sur des cartons, sont passés ensuite au compteur et leur radioactivité est mesurée comme suivant :

Une fois l'échantillon placé où il convient, on met le compteur en marche en même temps qu'un chronomètre, jusqu'à ce que le nombre de coups marqués par le compteur atteigne au moins 2000 pour les échantillons et 5000 pour les préparations témoins. On arrête le compteur et le chronomètre, et le nombre de coups par minute est calculé, avec déduction du mouvement propre.

On opère ainsi pour chaque échantillon, en inscrivant à chaque fois le nombre de coups marqués par le compteur, le nombre de minutes écoulées et la référence de l'échantillon.

Il est très important que tous les échantillons soient placés tous à la même distance du compteur et toujours au même endroit, exactement. Il est facile de répondre à cette exigence en traçant avec un crayon gras l'emplacement du premier échantillon et en y plaçant ensuite les suivants.

Nous opérons en plaçant la petite préparation plane, où la surface du sang desséché était de 4,9 cm², recouverte de cellophane adhésive et placée à 20 mm du compteur.

F - CALCULS

Pour donner une idée plus précise encore de ce mode opératoire, nous allons exposer une expérience entière avec ses mesures et ses calculs.

EXPERIENCE N° 11

Nom.-	Madame A. Marguerite
Age.-	54 ans

Poids 56 kg.
 Hématocrite 34 %
 Diagnostic Anémie Hypochrome.

Quantité de la suspension des globules marqués injectés

70 = Seringue pleine + 2,604
 70 = Seringue vide + 12,926.

12,926 - 2,604 = 10,322 grammes de suspension injectés

Préparation de la dilution de suspension témoin

40 = tube + 6,720
 40 = tube + sang + 6,632
 40 = tube + sang + soluté physiologique + 0,475

6,720 - 6,632 = 0,088 gramme de suspension initiale

6,720 - 0,475 = 6,245 grammes de dilution.

$$\frac{0,088}{6,245} \neq \frac{1}{71}$$

Préparation des échantillons pour les mesures

Avec la dilution de suspension témoin, on prépare les échantillons témoins :

T₁ 2 = Coupelle + 1,853)
 2 = " + dilution + 1,689 } 0,164

$$\begin{array}{rcll} T_2 & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,852 & \} & 0,176 \\ & 2 & = & " & + & \text{dilution} & + & 1,676 &) \end{array}$$

$$\begin{array}{rcll} T_3 & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,850 & \} & 0,332 \\ & 2 & = & " & + & \text{dilution} & + & 1,515 &) \end{array}$$

Avec le sang prélevé au malade 5, 10, 15, 20 minutes après l'injection, on prépare les échantillons suivants :

$$\begin{array}{rcll} E \ 5\text{min.} & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,852 & \} & 0,220 \\ & 2 & = & " & + & \text{sang} & + & 1,632 &) \end{array}$$

$$\begin{array}{rcll} E \ 10\text{min.} & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,850 & \} & 0,236 \\ & 2 & = & " & + & \text{sang} & + & 1,614 &) \end{array}$$

$$\begin{array}{rcll} E \ 15\text{min.} & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,850 & \} & 0,352 \\ & 2 & = & " & + & \text{sang} & + & 1,498 &) \end{array}$$

$$\begin{array}{rcll} E \ 20\text{min.} & 2 & = & \text{Coupelle} & + & 1,853 & \} & 0,343 \\ & 2 & = & " & + & \text{sang} & + & 1,510 &) \end{array}$$

Mesure au compteur

Calcul du mouvement propre : 420 coups en 20 minutes $\frac{420}{20} = 21$.

$$\begin{array}{l} T_1 : 1821 \text{ coups en 3 minutes} \\ \text{activité de } T_1 \text{ coups/min.} = \frac{1821}{3} - 21 = 607 - 21 = \underline{586} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} T_2 : 2088 \text{ coups en 3 minutes} \\ \text{activité de } T_2 \text{ coups/min.} = \frac{2088}{3} - 21 = 699 - 21 = \underline{675} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} T_3 : 2645 \text{ coups en 2 minutes} \\ \text{activité de } T_3 \text{ coups/min.} = \frac{2645}{2} - 21 = 1322 - 21 = \underline{1301} \end{array}$$

E 5min. 1544 coups en 6 minutes

$$\text{activité de E 5min. coups/min.} = \frac{1544}{6} - 21 = 257 - 21 = \underline{236}$$

E 10min. 1626 coups en 6 minutes

$$\text{activité de E 10min. coups/min.} = \frac{1626}{6} - 21 = 271 - 21 = \underline{250}$$

E 15min. 2230 coups en 6 minutes

$$\text{activité de E 15min. coups/min.} = \frac{2230}{6} - 21 = 372 - 21 = \underline{351}$$

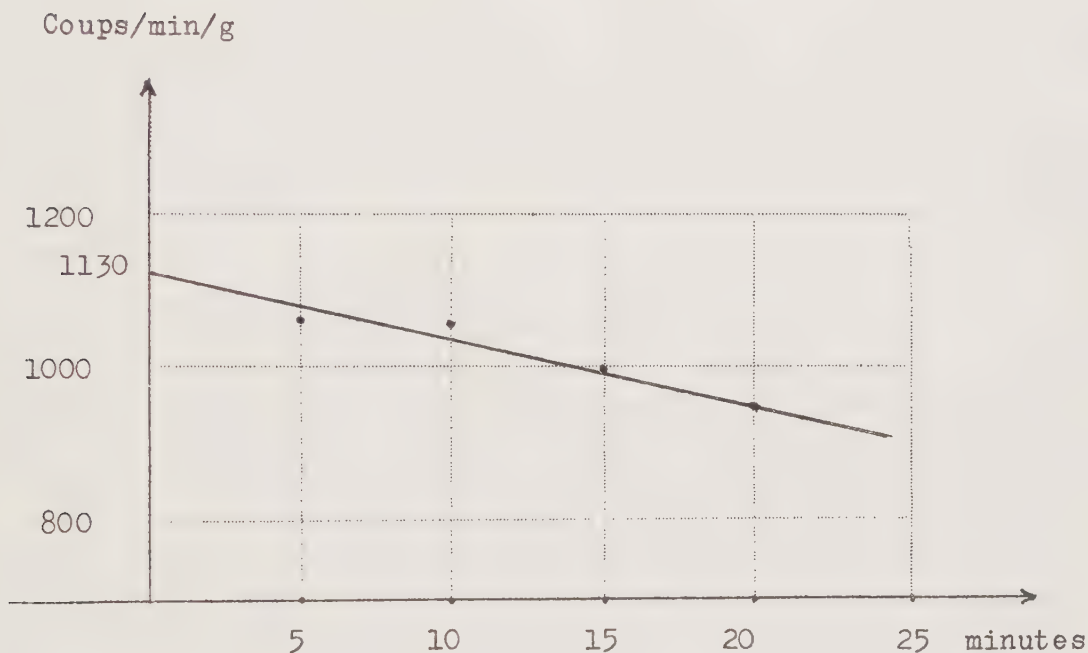
E 20min. 2776 coups en 8 minutes

$$\text{activité de E 20min. coups/min.} = \frac{2776}{8} - 21 = 347 - 21 = \underline{326}$$

Calcul. - On rapporte le nombre de coups émis par minute par chaque échantillon à l'unité de poids (gramme).

T_1	:	$\frac{586}{0,164}$	=	3573	coups/min./gramme
T_2	:	$\frac{675}{0,176}$	=	3822	" " "
T_3	:	$\frac{1301}{0,332}$	=	3913	" " "
E 5min.	:	$\frac{236}{0,220}$	=	1070	" " "
E 10min.	:	$\frac{250}{0,236}$	=	1059	" " "
E 15min.	:	$\frac{351}{0,352}$	=	996	" " "
E 20min.	:	$\frac{326}{0,343}$	=	948	" " "

Pour trouver le nombre de coups par minute d'1 gramme de sang prélevé au temps zéro, on établit une courbe en portant en ordonnée le nombre de coups par minute et en abscisse le temps de prélèvement après l'injection de la suspension des hématies marquées. La courbe ainsi établie est extrapolée au temps zéro, c'est-à-dire au moment où l'injection est faite, et on lit le nombre de coups qui serait donné par un gramme de sang au temps zéro.



Courbe 1 : Radioactivité des prélèvements successifs en fonction du temps.

Pour les échantillons témoins on prend la moyenne des trois échantillons T_1 , T_2 , T_3 .

$$\frac{3573 + 3822 + 3913}{3} = 3769 = T_m$$

A partir de cette valeur, on calcule la radioactivité totale injectée :

$$R.A. \text{ totale} = \frac{T_m}{\text{taux de dilution}} \times \text{poids de suspension injectée}$$

$$\text{Ici } R.A. \text{ totale} = \frac{3769 \times 10,322}{\frac{0,088}{6,2455}} = 2.755.000$$

Puisque la radioactivité du sang du malade ramenée au moment de l'injection est de 1130 coups/min./gramme, la masse sanguine brute est de :

$$\frac{2.755.000}{1130} = 2438 \text{ grammes}$$

Cette valeur ne représente pas exactement la masse sanguine, pour les raisons dont nous avons déjà parlées, mais sur lesquelles il est nécessaire de revenir avec plus de détails.

Lorsqu'on prend une suspension de globules marqués, en quantité connue, et qu'on l'injecte à un sujet, ces globules se répartissent uniformément parmi les globules naturels du sujet. Des expériences précises attestent l'uniformité de cette répartition. En prélevant ensuite du sang à ce sujet, et en mesurant la radioactivité de ses hématies, entièrement séparées de leur plasma - à supposer que cela soit possible - on obtient donc rigoureusement, par un calcul simple de dilution, sa masse globulaire totale.

Mais dans notre méthode opératoire, nous prélevons du sang à la veine du pli du coude, et nous mesurons la radioactivité d'un gramme de ce sang. Celle-ci est entièrement due aux globules rouges. La masse sanguine brute que nous pouvons calculer, par application

de la simple règle de dilution, représenterait la masse sanguine réelle si les deux conditions suivantes étaient remplies.

1.- les globules injectés devraient être répartis uniformément parmi les globules sanguins du sujet.

2.- le sang total prélevé devrait contenir la même proportion de globules que la totalité du sang du sujet.

Nous venons de voir que la première proposition peut être regardée comme toujours exactement vérifiée. Il n'en est pas de même de la seconde. En effet, les globules sont moins nombreux dans les capillaires que dans les gros vaisseaux, certainement pour des raisons hydrodynamiques.

Il revient au même de dire que l'hématocrite du sang veineux mêlé est supérieur à l'hématocrite somatique. Par conséquent, quand nous avons injecté des globules radioactifs, nous avons au fond, marqué à un taux plus élevé le sang veineux mêlé que le sang capillaire. Pour déduire la masse sanguine réelle de mesures faites sur le sang de la veine du pli du coude, il nous faut donc faire subir à ces mesures une correction. Celle-ci dépend du rapport entre l'hématocrite du sang veineux mêlé et l'hématocrite somatique. Ce rapport a été bien étudié, il est constant (Cf 1ère partie page 17) et il vaut :

$$\frac{\text{Hématocrite somatique}}{\text{Hématocrite veineux réel}} = 0,91$$

Puisque dans le sang veineux, il y a un excès de globules de 10 p. 100, par rapport à la moyenne prise pour le système circulatoire dans son ensemble, la radioactivité de 1 gramme du sang total de la veine du pli du coude est supérieure de 10 p. 100 à celle de 1 gramme de sang moyen.

Nous obtiendrons donc la masse sanguine réelle :

$$\text{Masse sanguine réelle} = \frac{\text{Masse sanguine brute}}{0,91}$$

$$\text{Masse sanguine réelle} = \text{Masse sanguine brute} \times 1,10$$

Il est évident qu'il ne faut pas tenir compte ici des corrections de l'hématocrite qui permettent de passer de la valeur lue dans le tube de Wintrobe à la valeur réelle (présence de plasma interposé entre les hématies, couche de globules blancs). En effet, ce facteur est uniquement expérimental et tient à la manière dont est habituellement pratiquée la mesure de l'hématocrite.

Il pouvait paraître a priori qu'en injectant du sang marqué à un sujet, et en faisant ensuite des mesures sur le sang total prélevé, on pourrait déterminer la masse sanguine sans intermédiaire d'aucun facteur. Mais au fond, c'est uniquement parce que le prélèvement veineux ne représente pas un échantillon moyen - il contient relativement trop de globules, qui sont seuls marqués - qu'il faut faire une correction. Dans notre exemple nous avons donc :

$$\text{Masse sanguine réelle} = 2438 \times 1,10 = \underline{2682} \text{ grammes}$$

On pourrait objecter qu'il reviendrait au même de mesurer le volume globulaire total, en faisant des mesures de radioactivité sur les globules du malade isolés, après l'injection, puis d'utiliser l'hématocrite (corrigé et ramené à sa valeur somatique) pour connaître la masse sanguine totale. Mais cette méthode est plus longue, et surtout moins précise. En effet, elle nécessite une mesure de l'hématocrite veineux réel qui est très délicate et en outre une séparation totale des globules de leur plasma (pour les mesures de radioactivité).

Dans notre technique, comme nous l'avons souligné, c'est seule-

ment le rapport :

$$\frac{\text{Hématocrite somatique}}{\text{Hématocrite veineux réel}}$$

qui intervient. Cette façon de faire évite donc toute mesure d'hématocrite et les erreurs qui en résultent.

RESULTATS

Tous nos résultats figurent à la fin de cette partie dans un tableau général.

Au cours de nos expériences, nos variantes ont surtout porté sur la façon de calculer la radioactivité totale injectée.

Nous avons signalé plus haut que cela présentait la partie la plus délicate de la Technique, à cause de grande tendance des hématies à la sédimentation dans le milieu peu visqueux de dilution.

Comme nous l'avons dit, nous avons évité toute erreur provenant des mesures volumétriques en pesant les échantillons avec une balance de précision à $\frac{1}{2}$ milligramme.

Lors de la première moitié de nos expériences, nous avons essayé de préparer notre dilution de suspension témoin dans du soluté physiologique. Nous avons toujours préparé avec cette dilution trois et même quelquefois quatre échantillons témoins, pour prendre la moyenne des mesures. Nous avons trouvé en général pour les trois échantillons préparés à partir de la même dilution, un écart avec la moyenne qui ne dépasse pas 5 p. 100. Si un des échantillons donne un écart supérieur à 6 p. 100, comme cela se produit rarement, il n'est pas pris en considération. Nous avons pensé que ces écarts se produisent parce qu'il est difficile de mettre les hématies en suspension uniforme dans du soluté physiologique.

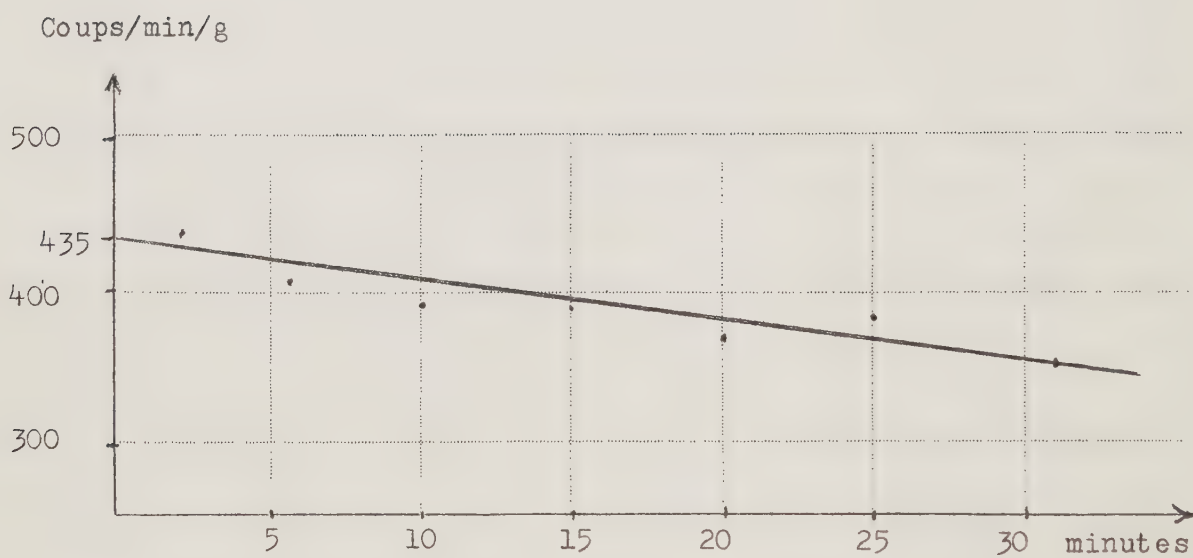
Pour cette raison nous avons essayé de diluer la suspension initiale avec le sang total du malade lui-même; il était naturelle-

ment beaucoup plus facile d'obtenir une suspension homogène par ce procédé; mais les expériences que nous avons faites avec cette variante ne nous ont pas donné une meilleure précision.

Certains auteurs pensent qu'il vaut mieux diluer la suspension initiale au même taux que dans le courant circulatoire, après l'injection. Cela représente une dilution d'environ $1/350$ et conduit à mesurer au compteur presque la même radioactivité que les échantillons du sang prélevé après injection. Ce procédé n'est réalisable, dans notre technique, que par deux dilutions successives (étant donné qu'avec une seule dilution on aurait besoin d'un volume trop important du sang non radioactif du sujet). Nous avons préparé une première fois une dilution au $1/15$ et ensuite, avec cette dilution, effectué une seconde dilution au $1/20$; ce qui donne une dilution finale au $1/300$. Mais malheureusement, bien que les erreurs au cours de quatre pesées soient négligeables, il y a à considérer trois fois l'erreur due aux répartitions non uniformes des hématies dans les trois suspensions successives, ce qui au total cause une erreur finale encore plus importante que dans l'autre technique.

En conclusion nous avons choisi le deuxième mode de dilution, c'est-à-dire, la dilution de la suspension globulaire dans du propre sang du malade à un taux qui varie de $1/20$ à $1/70$, selon la quantité du sang non radioactif dont on peut disposer.

Voici maintenant six expériences qui illustrent chacun des trois modes de dilution utilisés (2 expériences pour chaque variante) :



Courbe 2 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

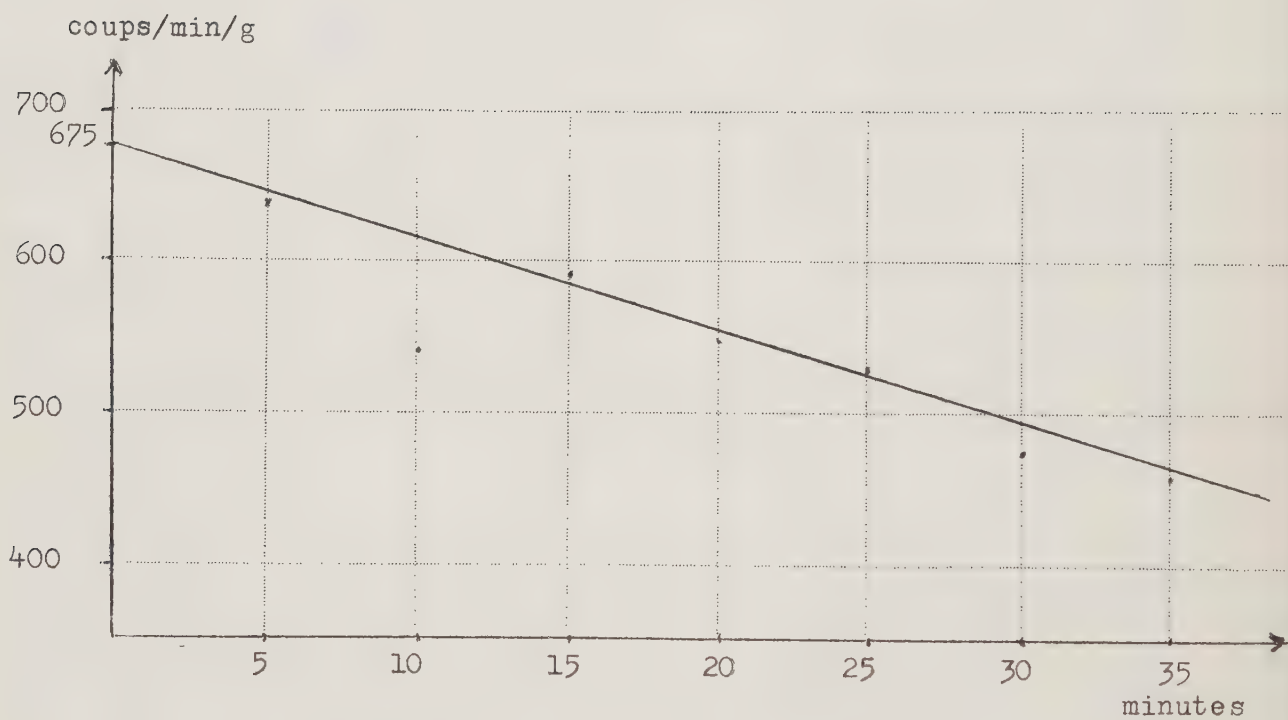
EXPERIENCE N° 14

Nom..... Monsieur V. Jean
 Age..... 72 ans
 Poids..... 45 kg.
 Hématocrite..... 14 p. 100
 Diagnostic..... Leucose aigüe leucopénique

(Dilution faite avec le soluté physiologique)

Grammes de suspension injectés		13,800
Taux de dilution		$\frac{0,168}{4,640} \# \frac{1}{28}$
Coups / min. / gramme	T1 = 3457	$T_m = \frac{3457 + 3332}{2} = 3394$
	T2 = 3332	
	T3 = 2941	
	E 2min. = 437	E Omin=435 par extrapolation (courbe N° 2)
	E 5 " 30s = 402	
	E 10 " = 391	
	E 15 " = 389	
	E 20 " = 369	
	E 25 " = 378	
	E 31 " = 352	
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		3394 (moyenne de 2 échantillons)
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{3394}{\frac{0,168}{4,640}} = 93.470$
Coups/min. total injectés		$93.470 \times 13,800 = 1.290.000$
Masse sanguine réelle (grammes)		3262

Les écarts des deux échantillons T1, T2, avec la moyenne sont de : 6 p. 100, 2,8 p. 100. T3 n'est pas pris en considération ayant un écart de 9,3 p. 100 avec la moyenne des trois échantillons.



Courbe 3 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

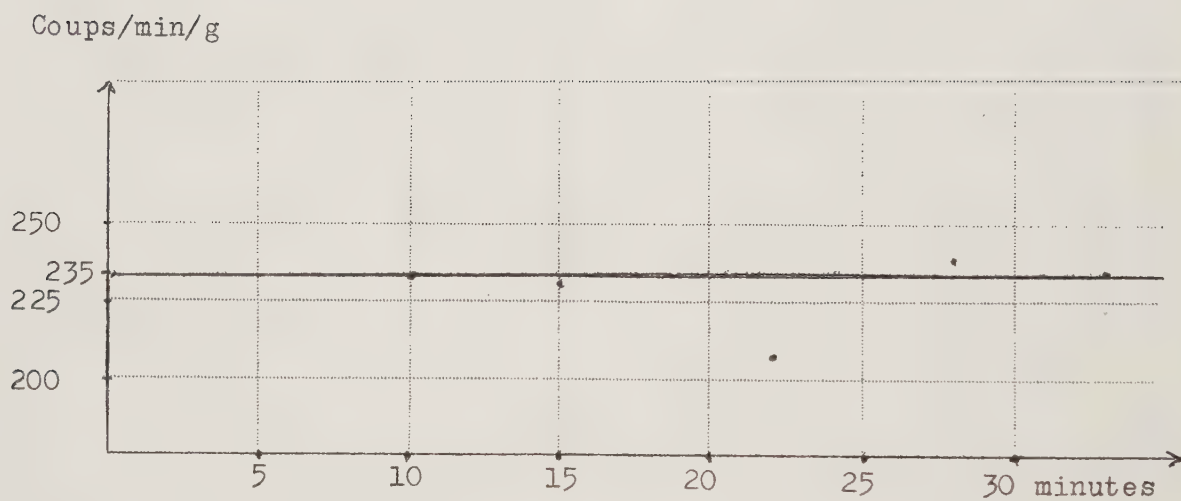
EXPERIENCE N° 16

Nom Madame B. Monique
 Age 73 ans
 Poids 51kg.500
 Hématocrite 20,5 p. 100
 Diagnostic Anémie Biermer

(Dilution faite avec le soluté physiologique)

Grammes de suspension injectés		12,1295
Taux de dilution		$\frac{0,159}{5,082} \cdot \# \frac{1}{32}$
Coups/min/gramme	T1 = 4332	$T_m = \frac{4332 + 4137 + 4026}{3} = 4165$
	T2 = 4137	
	T3 = 4026	
	E 5min. = 639	E 0min. = 675 par extrapolation (courbe n° 3)
	E 10 " = 539	
	E 15 " = 591	
	E 20 " = 550	
	E 25 " = 527	
	E 30 " = 478	
	E 35 " = 461	
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		4165 (moyenne de 3 échantillons)
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{4165}{\frac{0,159}{5,082}} = 132.718$
Coups/min. total injectés		$132.718 \times 12,1295 = 1.610.000$
Masse sanguine réelle (grammes)		2.624

Les écarts des trois échantillons T1, T2, T3 avec la moyenne sont de : 4 p. 100, 0,6 p. 100, 3 p. 100.



Courbe 4 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

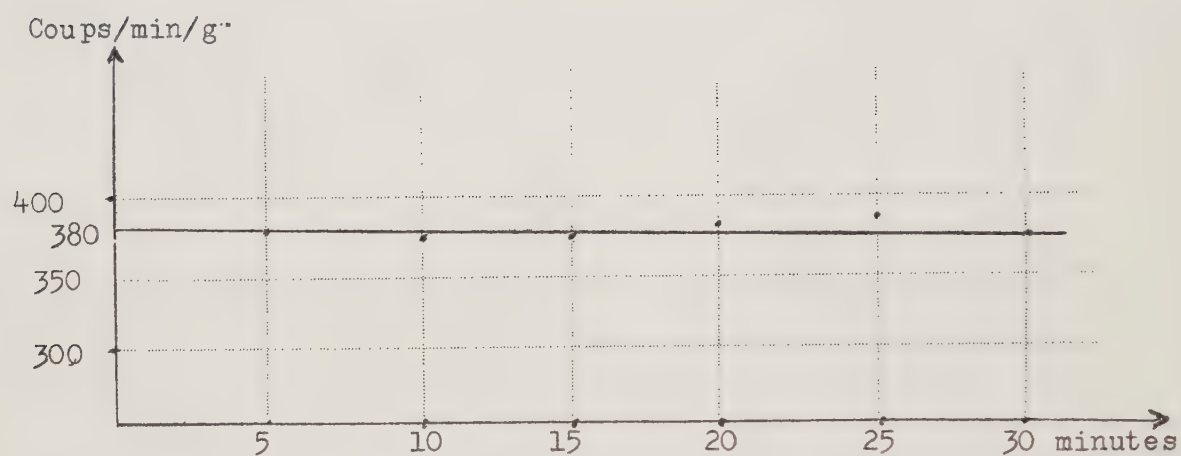
EXPERIENCE N° 20

Nom Monsieur V. Michel
 Age 26 ans
 Poids 72 kg. 650
 Hématocrite 36 p. 100
 Diagnostic Normal

(Dilution faite dans le propre sang du sujet)

Grammes de suspension injectés		13,799
Taux de dilution		$\frac{0,238}{5,325} \quad \# \quad \frac{1}{23}$
Coups / min. / gramme	T1 = 5826	$T_m = \frac{5826 + 5712 + 5323}{3} = 5620$
	T2 = 5712	
	T3 = 5323	
	E 10min. = 236	E 0min. = 235 par extrapolation (courbe 4)
	E 15 " = 233	
	E 22 " = 208	
	E 28 " = 238	
	E 33 " = 236	
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		5620 (moyenne de 3 échantillons)
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{5620}{\frac{0,238}{5,325}} = 125.741$
Coups/min. injectés		$125.741 \times 13,799 = 1.735.000$
Masse sanguine réelle (grammes)		8.121

Les écarts des trois échantillons T₁, T₂, T₃ avec la moyenne sont de : 3,6 p. 100, 1,2 p. 100, 5 p. 100.



Courbe 5 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

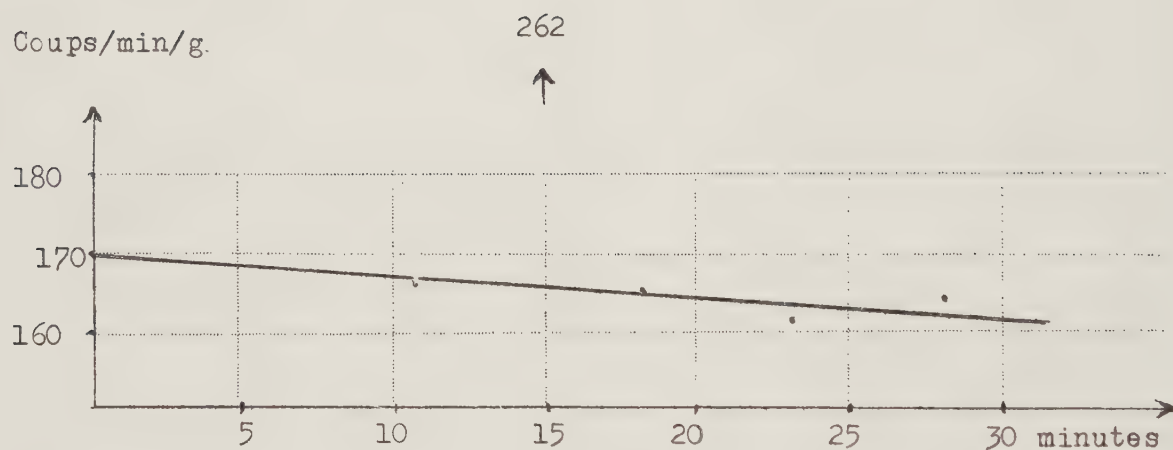
EXPERIENCE N° 22

Nom Monsieur K. Ommar-Ben
 Age 25 ans
 Poids 59 kg. 800
 Hématocrite 41 p. 100
 Diagnostic normal

(Dilution faite dans le propre sang du sujet)

Grammes de suspension injectés		14,058
Taux de dilution		$\frac{0,185}{3,002}$
Coups / min. / gramme	T1 = 8334	$T_m = \frac{8334 + 8289 + 8088}{3} = 8237$
	T2 = 8289	
	T3 = 8088	
	E 5min. = 380	E Omin. = 380 par extrapolation (courbe 5)
	E 10 " = 375	
	E 15 " = 375	
	E 20 " = 380	
	E 25 " = 383	
	E 30 " = 375	
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		8237
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{8237}{\frac{0,185}{3,002}} = 133.684$
Coups/min. injectés		$133.684 \times 14,058 = 1.879.000$
Masse sanguine réelle (grammes)		5.413

Les écarts des trois échantillons T1, T2, T3 avec la moyenne sont de : 1 p. 100, 0,6 p. 100, 1,8 p. 100.



Courbe 6 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

EXPERIENCE N° 23

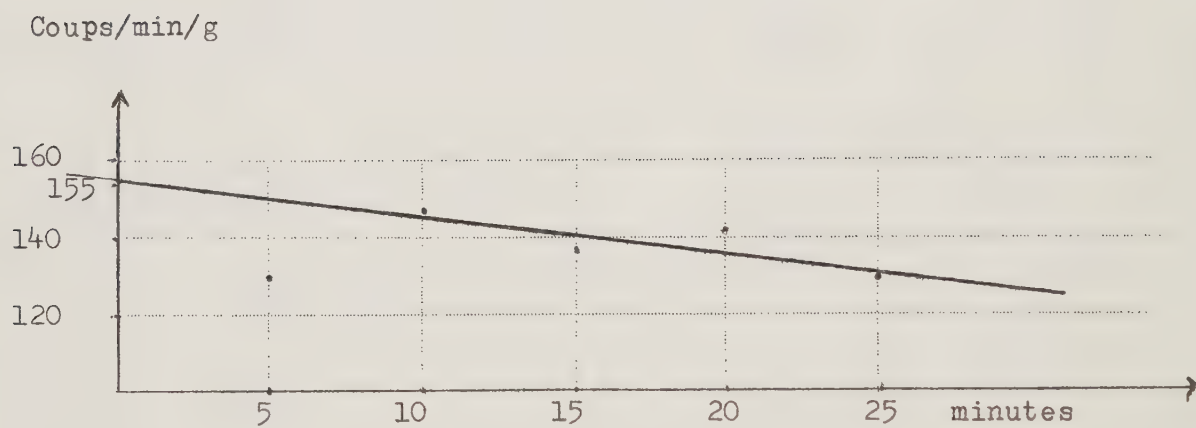
Nom Monsieur F. Marcel
 Age 50 ans
 Poids 49 kg. 900
 Hématocrite 31 p. 100
 Diagnostic Cancer de l'estomac

(Dilution faite avec le sang du sujet; double dilutions)

Grammes de suspension injectés		13,620
Taux de dilution		$\frac{0,143}{3,213} \rightarrow \frac{0,132}{1,556} \quad \# \quad \frac{1}{264}$
Coups / min. / gramme	T1 = 129	$T_m = \frac{129 + 124 + 132}{3} = 128$
	T2 = 124	
	T3 = 132	
	E 10min.30s = 163	E 0min. = 170 par extrapolation (courbe 6)
	E 15 " = 262(*)	
	E 18 " = 161	
	E 23 " = 153	
	E 28 " = 159	
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		128
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{128}{\frac{0,143}{3,213} \times \frac{0,132}{1,556}} = 33.779$
Coups/min. injectés		$33.779 \times 13,620 = 460.000$
Masse sanguine réelle (grammes)		2.976

Les écarts des trois échantillons T₁, T₂, T₃ avec la moyenne sont de : 0,7 p. 100, 3 p. 100, 3 p. 100.

(*) E 15min. présente une activité grande parce que le sang coulait mal, et il n'est pas pris en considération.



Courbe 7 : Radioactivités des prélèvements successifs
en fonction du temps.

EXPERIENCE N° 24

Nom Monsieur P. Paul
 Age 22 ans
 Poids 64 kg.
 Hématocrite 46 p. 100
 Diagnostic Sternberg

(Dilution faite avec le sang du malade; double dilutions)

Grammes de suspension injectés		14,492	
Taux de dilution		$\frac{0,126}{2,804} \longrightarrow \frac{0,160}{3,314} \neq \frac{1}{461}$	
Coups / min. / gramme	T1 = 102	$T_m = \frac{81}{2} + \frac{86}{2} = 83$	
	T2 = 81		
	T3 = 86		
	E 5min. = 129	$E_{0min.} = 155 \text{ par extrapolation (courbe 7)}$	
	E 10. " = 147		
	E 15 " = 136		
	E 20 " = 142		
	E 25 " = 130		
Coups/min. d'un gramme de dilution témoin		83	
Coups/min. d'un gramme de suspension initiale injectée		$\frac{83}{\frac{0,126}{2,804} \times \frac{0,160}{3,314}} = 38.257$	
Coups/min. injectés		$38.257 \times 14,492 = 554.000$	
Masse sanguine réelle (grammes)		4.062	

Les écarts des deux échantillons T2, T3 avec la moyenne sont de : 2 p. 100, 3 p. 100. T1 ayant un écart de 14 p. 100 avec la moyenne des trois échantillons, n'est pas pris en considération.

Sur les 7 courbes indiquées, on remarque que la décroissance de la radioactivité du sang total chez les malades est très différente suivant les cas. Toutes nos courbes ont été établies avec des échelles relatives, comparables, et la décroissance est beaucoup plus grande dans les cas 24, 16, 11, 14 par comparaison aux cas 20, 22 et 23.

Suivant les divers auteurs, la perte de la radioactivité par les hématies dans le sang après l'injection est de :

4,6	p. 100	en 20 minutes	:	Hahn et Hevesy ⁽²⁸⁾
8	p. 100	" " "	:	Anderson ⁽³⁰⁾
16	p. 100	" " "	:	Hevesy et collaborateurs ⁽³¹⁾
1-4	p. 100	" " "	:	Reeve et Veall ⁽³⁵⁾
1,3	p. 100	" " "	:	Berson et Yalou ⁽²⁷⁾

Reeve et Veall prétendent que si l'on utilise pour le marquage des hématies du phosphore radioactif avec une radioactivité spécifique élevée, la perte de la radioactivité par les globules est réduite à 3 p. 100 en 60 minutes. Cette constatation est très étonnante, car on ne conçoit pas comment l'activité de la solution de P^{32} pourrait avoir une influence sur la vitesse de passage globules - plasma.

Nylin⁽³²⁾ a montré que chez l'homme normal, il n'y a pas de perte de P^{32} par les hématies pendant la première heure qui suit l'injection.

Kelly et Simonsen⁽³⁴⁾ sont du même avis.

En ce qui nous concerne, dans 24 expériences, nous avons trouvé une perte de P^{32} par les hématies dans le sang, très variable suivant les sujets. Nous avons calculé la fraction perdue par les globules en 20 minutes et les avons porté sur le tableau général dans la dernière colonne. On constate, en effet, que la perte de P^{32} par les hématies, in vivo, pendant les 20 minutes qui suivent l'injection des hématies marquées, est comprise entre 0,50 et 27 p. 100. Nous avons observé une fois une perte de 0 p. 100 (Expérience 20) et une fois de 56 p.

100 (Expérience 1).

On peut se demander à quoi est dû ce phénomène : on peut faire l'hypothèse d'un passage du radiophosphore des hématies dans le plasma, suivi d'une rapide diffusion dans l'organisme, ou d'une fixation sur l'endothélium. Si cette hypothèse était justifiée, il resterait à savoir si de tels malades présentent une moins grande affinité de leurs hématies pour l'anion phosphorique : l'adsorption serait plus lâche et plus facilement réversible. Peut-être aussi, la durée nécessaire de contact à une bonne fixation varie-t-elle d'un malade à l'autre.

On peut rapprocher cette inconstance dans la fixation du P^{32} par les hématies, des travaux de Hevesy et ses collaborateurs⁽³¹⁾ qui ont constaté que le P^{32} se fixe dans les globules, par diffusion de l'ion phosphorique à travers la membrane, puis par échange avec les ions phosphates du triphosphate d'adénosine et des hexoses-monophosphates, le P^{32} sera partagé entre le phosphore organique acido-soluble et les ions phosphates (phosphore minéral). La première liaison est plus solide que la seconde. Suivant la quantité de phosphore organique acido-soluble, on conçoit qu'elle peut varier d'un sujet à l'autre, le P^{32} sera plus ou moins énergiquement lié aux globules. De toute façon, l'échange entre les globules et le plasma ne peut se faire que par l'intermédiaire des ions phosphates.

En conclusion, cette perte grande ou petite, n'affecte en aucune façon nos résultats, car nous avons effectué, pour chaque sujet, des prélèvements successifs du sang, à des intervalles de temps croissants, après la réinjection de la suspension d'hématies marquées. La courbe de décroissance de l'activité du sang (perte de P^{32}) en fonction du temps est établie et la radioactivité au temps zéro est calculée.

Numéro d'ordre d'expérience	Nom Age Poids Hématocrite Diagnostic	Poids en grammes de suspension injectée	Taux de dilution de suspension témoin	Radioactivité d'1lg de dilution de suspension témoin (moyenne de 3 échantls) coups/min/g	Radioactivité d'1lg de suspension injectée coups/min/g
15	Mr B. Patrick 78 ans 40 kg 25 % Leucose aigüe	12,768	$\frac{0,155}{1,266} \# \frac{1}{8}$	3.377	27.5
16	Mme B. Ginette 73 ans 51 kg 500 21 % Maladie de Biermer	12,1295	$\frac{0,159}{5,082} \# \frac{1}{32}$	4.165	132.7
17	Mr D. François 22 ans 66 kg 250 28 % Anémie hypochrome	13,860	$\frac{0,179}{4,578} \# \frac{1}{26}$	11.465	292.4
17	Mme I. Anik 38 ans 55 kg 900 41 % normale	12,712	$\frac{0,299}{5,165} \# \frac{1}{17}$	21.119	364.8
19	Mr C. Antonin 72 ans 56 kg 250 45 % Asthme emphys.	12,077	$\frac{0,174}{4,292} \# \frac{1}{25}$	11.222	276.0
20	Mr V. Michel 26 ans 72 kg 650 36 % Anémio	13,799	$\frac{0,238}{5,325} \# \frac{1}{22}$	5.620	125.7
21	Mr B. Jacques 28 ans 88 kg 43 % Ancien tuberculeux	11,741	$\frac{0,204}{4,101} \# \frac{1}{20}$	12.343	247.5
22	Mr K.Omer-ben 25 ans 59 kg 800 41 % normal	14,058	$\frac{0,185}{3,002} \# \frac{1}{16}$	8.237	133.6

Radioactivité totale injectée coups/min	Nombre d'échan- tillons prélevés pour établir la courbe	Radioactivité d'1 g du sang prélevé extrapolée au temps 0 coups/min/g	MASSE SANGUINE REELLE grammes	MASSE SANGUINE RELATIVE <u>grammes</u> kg	Parte de P^{32} par les hématies 20 minutes après l'injection
352.000	9	180	2.151	53,77	16,6 %
1.610.000	7	675	2.624	50,9	17,7 %
4.053.000	4	980	4.549	68,50	0,51 %
4.638.000	6	1.440	3.543	63,2	8,6 %
3.333.000	5	650	5.640	100,7	2,3 %
1.735.000	5	235	8.121	112	0 %
2.907.000	6	275	11.628	133	3,6 %
1.879.000	6	380	5.413	91,7	1,3 %

Numéro d'ordre d'expérience	Nom Age Poids Hématocrite Diagnostic	Poids en grammes de suspension injectée	Taux de dilution de suspension témoin	Radioactivité d'lg de dilution de suspension témoin (moyenne de 3 échantls) coups/min/g	
23	Mr F. Marcel 65 ans 49 kg 900 31 % Cancer de l'estomac	13,620	$\frac{0,143}{3,213} \times \frac{0,132}{1,556}$ # $\frac{1}{264}$	128	
24	Mr P. Paul 22 ans 64 kg 46 % Maladie de Sternberg	14,492	$\frac{0,126}{2,804} \times \frac{0,160}{3,314}$ # $\frac{1}{461}$	83	

Radioactivité totale injectée coups/min	Nombre d'échan- tillons prélevés pour établir la courbe	Radioactivité d'1 g du sang prélevé extrapolée au temps 0 coups/min/g	MASSE SANGUINE REELLE grammes	MASSE SANGUINE RELATIVE <u>grammes</u> kg	Perte de P ³² par les hématies 20 minutes après l'injection
460.000	5	170	2.976	59,5	6 %
555.000	5	150	4.062	63,4	13 %

C O N C L U S I O N S

C O N C L U S I O N S

Nous avons fait une revue générale de toutes les mesures de la masse sanguine utilisées jusqu'à présent.

Parmi les méthodes courantes, celle dont on se sert le plus souvent en clinique est la méthode aux colorants qui mesure le volume plasmatique. Pour évaluer le volume sanguin, on doit connaître l'hématocrite; ce qui entraîne, d'une part des erreurs de lecture de celui-ci, et d'autre part des erreurs due à la différence de la concentration en globules du sang dans les grands vaisseaux et dans les capillaires. Ces erreurs corrigibles jusqu'à un certain degré par un coefficient expérimental, sont relativement peu importantes par rapport aux suivantes :

les colorants se fixent sur les parois des capillaires et des éléments figurés de sang. Ils passent dans la lymphe et s'éliminent un peu par la voie rénale. Les colorants à grosses molécules sont au contraire fixés par le système réticulo-endothélial, d'où, dans tous les cas, une appréciation trop élevée du volume plasmatique et, du volume sanguin.

Les méthodes de détermination du volume sanguin, utilisant certains corps chimiques tels que : polyvinylpyrrolidone - tétraiodophénol-phthaléïne, etc... présentent aussi les mêmes inconvénients. En outre, elles possèdent le désavantage d'un dosage chimique délicat et souvent long.

La méthode à l'oxyde de carbone est une mesure directe du volume globulaire. Elle présente l'inconvénient d'utiliser un corps toxique, dangereux chez les sujets anémiques et cardiaques. Au surplus, l'oxyde de carbone se fixe aussi sur la myoglobine des muscles, ce qui entraîne une surestimation du volume sanguin.

Enfin la mesure du volume plasmatique par la sérum albumine marquée à l'iode, nécessite des manipulations non aseptiques qui la rendent extrêmement délicate à appliquer chez l'homme.

Les méthodes utilisant : les hématies marquées par les radio-isotopes tels que : Fe^{59} , Cr^{51} , K^{42} , P^{32} , offrent l'avantage de donner des résultats bien plus précis et permettent de déterminer infailliblement le volume globulaire total. Ces méthodes sont à peu près similaires et se distinguent par les particularités suivantes :

Le fer radioactif se lie d'une façon permanente à l'hémoglobine des hématies, néanmoins il présente d'importants inconvénients qui rendent cette méthode impraticable en clinique : les globules marqués au fer radioactif ne s'obtiennent qu'in vivo, ce qui nécessite la présence d'un donneur ayant un sang compatible avec celui du malade. L'isotope Fe^{55} du fer, à longue période, étant ordinairement associé avec l'isotope à courte période Fe^{59} , expose le donneur et le malade aux risques d'une longue irradiation. Le fer radioactif partage avec le chrome radioactif, l'inconvénient d'une période relativement longue et la difficulté de la mesure de la radioactivité, car ils émettent, tous deux, des rayonnements gamma. Le potassium radioactif, possède au contraire une période courte (12,4 heures) qui le rend difficile à utiliser en pratique.

Envisageant plus précisément la méthode au P^{32} , nous avons étudié son développement depuis la publication originelle de Hahn et Hevesy (1940).

En ce qui concerne le marquage des hématies, on préparait au début des globules marqués à partir du sang du malade, en le laissant

en contact avec le phosphate marqué au P^{32} , on injectait ensuite au malade le sang total ainsi traité. Cette façon de faire présentait l'inconvénient d'injecter au malade en même temps du plasma radioactif. La préparation des globules marqués lavés fut un grand progrès, qui a fait de la méthode au P^{32} une méthode réellement précise. Les globules marqués au P^{32} en suspension dans du soluté physiologique perdent régulièrement de 1 à 3 p. 100 de leur radioactivité par heure.

Au début, les mesures de radioactivité étaient faites sur le phosphate-ammoniac-magnésien isolé du sang. Un peu plus tard, on a effectué les mesures de radioactivité sur un volume connu de sang, desséché à 100°C , ou sur l'hémolysat des globules.

Jusqu'ici toutes les déterminations ont été faites par l'intermédiaire des mesures de volumes, qui laisse toujours une certaine marge d'erreur lorsqu'il s'agit de sang pur ou dilué. En outre, la perte du P^{32} par les globules in vivo, a été estimée constante par tous les auteurs. Mais d'un auteur à l'autre, elle varie de 1 p. 100 à 16 p. 100 en 20 minutes. C'est une cause d'erreur importante, qui n'avait pas été prise en considération.

Nous avons expérimenté une méthode qui tient compte de toutes ces remarques et nous avons opéré avec les précautions suivantes :

1.- Nous avons préparé des hématies marquées par contact à 37°C avec une solution de phosphate disodique radioactif. Nous avons lavé les hématies avec du sérum physiologique porté à 4°C .

2.- Avec une balance de précision nous avons pesé la quantité de suspension injectée, et nos mesures de radioactivité sont faites sur un échantillon du poids connu. En outre, pour préparer les échantillon de référence dilués, nous avons procédé par pesée (pour le sang comme pour le liquide de dilution).

3.- Nous avons injecté au sujet avant chaque expérience, de

l'héparine pour éviter la coagulation pendant la durée de l'épreuve qui fausse les résultats comme nous l'avons montré.

4.- Après l'injection des hématies marquées, nous avons fait des prélèvements de sang régulièrement espacés et avons étudié, pour chaque malade, la décroissance de la radioactivité du sang en fonction du temps. Nous avons déterminé la radioactivité du sang au moment de l'injection en extrapolant la courbe au temps zéro.

Pour le calcul de nos résultats, nous avons montré que la dilution des globules dans l'organisme permettait une mesure précise de la masse globulaire. Si on mesure, comme tous les auteurs ont fait, la radioactivité du sang total après répartition uniforme des hématies marquées, on ne peut pas obtenir directement la masse sanguine réelle. Il faut appliquer un coefficient d'hématocrite, parce que les globules ne sont pas répartis uniformément dans tous les vaisseaux du corps. Cette correction nous donne :

Masse sanguine réelle $\longrightarrow$ Masse sanguine trouvée x 1,10

Avec cette technique, nous avons relevé deux ordres de faits qui ne sont pas facilement explicables :

- d'une part, nous avons observé au cours de nos prélèvements répétés de sang une augmentation considérable de la radioactivité du sang, si celui-ci coulait difficilement à cause d'un début de coagulation.

- d'autre part, nous avons constaté une décroissance de la radioactivité du sang du sujet, après l'injection, qui varie largement d'un sujet à l'autre.

B I B L I O G R A P H I E

B I B L I O G R A P H I E

- OUVRAGES GENERAUX -

- 1 - CAZAL P.
La Masse Sanguine et sa Pathologie, Paris, Masson et Cie, 1955.
- 2 - GUILLOT M.
Aide-Mémoire de Physique (cours de la Faculté de Pharmacie),
Paris, C.D.U., 1954.
- 3 - HAMBURGER J. et MATHE G.
Métabolisme de l'Eau, Paris, Flammarion, 1952.
- 4 - HOUSSAY B.A.
Physiologie humaine, Paris, Flammarion, 1950.
- 5 - POLONOVSKI M.
Pathologie chimique, Paris, Masson et Cie, 1952.
- 6 - ROGER G.H. et BINET L.
Traité de Physiologie normale et pathologique, Paris, Masson
et Cie, 1934, 7.

MEMOIRES PARTICULIERES

- 30 - ANDERSON R.S.
The use for radioactive phosphorus for determining circula-
tion erythrocyte volumes.
(Amer. J. Physiology., 1942, 137, 539)
- 15 - ASHBY W.
Method for determining whole blood volume based on the cir-
culating corpuscle volume.
(Arch. Int. Med., 1925, 35, 516)

- 1 - BARNES D.W.H., LOUTIT J.F. et REEVE E.B.
A comparison of estimates of circulating red blood cell volume given by the Ashby marked red cell method and the Tl824 - Hematocrite method in man
(Clin. Sci., 1948, 7, 135)
- 27-37 - BERSON S.A. and YALOU R.S.
The use of K⁴² or P³² labelled erythrocytes and I¹³¹ tagged human serum albumine in simultaneous blood volume determination
(J. clin. Investig., 1952, 31, 572).
- 38 - BERSON S.A., YALOU R.S., AZULAY A., SCHREIBER S. and ROSWIT B.
The biological decay curve of P³² tagged erythrocytes - Application to the study of acute changes in blood volume.
(J. clin. Investig. 1952, 31, 581)
- 29 - BROWN F.A., HEMPELMAN L.H. and ELMAN R.
The determination of blood volume with red cells containing radioactive phosphorus (P³²)
(Science, 1942, 96, 323)
- 16 - CACHERA R., BARBIER P.
L'épreuve jumelée au rhodanate de sodium et au bleu de Chicago.
(Paris médical, 1942, 32, 29)
- 12 - CHANG H.C. and HARROP G.A.
The determination of the circulating blood volume with carbon monoxide.
(J. clin. Investig., 1928, 5, 393)
- 39 - CHAPLIN H.S.
Precision of red cell volume measurement using P³² labelled cells
(J. Physiology., 1954, 123, 22)
- 23 - CRISMER R.
Vitesse et mode d'élimination de l'acide (oxy-4-diiodo-3-5-phényl) β phénol- α -propionique chez l'homme
(C. R. Soc. Biol. 1946, 140, 907.- 819 - 1043)
- 22 - DELARIO A.J.
Paths of absorption and excretion of sodium tetraiodophenol-phtaleïne
(J. Lab. Clin. med. 1930, 16, 329)

- 20 - DUIZEND M.
Etude d'une méthode de mesure des liquides extracellulaires
par le mannitol chez des sujets sains et chez des malades
atteints de néphropathie
(Th. Doct. Med., Paris, 1950)
- 5-25 - GIBSON J.G., PEACOCK W.C., SELIGMAN A.M. and SACK T.
Circulating red cell volume measured simultaneously by the
radioactive iron and dye methods.
(J. clin. Investig., 1946, 25, 838)
- 24 - GIBSON J.G., WEISS S., ROBLEY D., EVANS, WENDELL G.,
PEACOCK J.W., IRVINE J.G., WILFRED M, GOUD W.M. and KIP A.F.
The measurement of the circulating red cell volume by means
of two radioactive isotopes of iron.
(J. clin. Investig., 1946, 25, 616)
- 26 - GRAY S.J. and STERLING K.
Determination of circulating red cell volume by radioactive
chromium.
(Science, 1950, 112, 179)
- 8 - GREHANT N. ET QUINQUAUD C.E.
Mesure du volume de sang contenu dans l'organisme d'un mammi-
fère vivant.
(C. R. Acad. Sci., 1882, 94, 1450)
- 9 - GREHANT N. et QUINQUAUD C.E.
Mesure du volume de sang contenu dans l'organisme d'un mammi-
fère vivant.
(J. Anat. Physiol., 1882, 18, 564)
- 10 - GREHANT N. ET QUINQUAUD C.E.
Recherches de physiologie pathologique sur la respiration
(J. Anat., 1882, 18, 469)
- 28 - HAHN L. and HEVESY G.
A method of blood volume determination.
(Acta physiol. scandin., 1940, 1, 3)
- 11 - HALDANE J.S. and SMITH J.S.
The masse and oxygene capacity of the blood in man
(J. Physiology., 1900, 25, 331)
- 13 - HAMBURGER J. et MATHE G.
(Métabolisme de l'Eau, 1952, p. 176)

- 3 - HARTMANN L. et LOVERDO A.
Calcul d'un facteur de correction de l'hématocrite à l'aide
de l'albumine marquée par I^{131} .
(Semaine des Hôpitaux, 1955, 6, B.287, numéro spécial de
Biologie)
- 40 - HARTMANN L., LOVERDO A. et FAUVERT R.
La mesure du volume sanguin total par les techniques des hé-
maties marquées au P^{32} et au Cr^{51} .
(Semaine des Hôpitaux, 1955, 6, B.283, numéro spécial de
Biologie)
- 31 - HEVESY G.V., KOSTER K.H., SORENSEN G., WARBURG E. and
ZERAHN K.
The red corpuscle content of the circulating blood determi-
ned by labelling the erythrocytes with radiophosphorus
(Acta med. scandin., 1944, 116, 561)
- 34 - KELLY F.J., SIMONSEN D.H. and ELMAN R.
Blood volume determinations in the human with red cells
containing radioactive phosphorus (P^{32}) and with pure human
albumin.
(J. clin. Investig., 1948, 27, 795)
- 7 - MALASSEZ L.
Nouveaux procédés pour apprécier la masse totale du sang.
(Archives de Physiologie, 1874, p. 797)
- 36 - NACHMAN H.M., JAMES G.W., MOORE J.W. and EVANS E.I.
Comparative study of red cell volumes in human subjects
with radioactive phosphorus tagged red cells and T1824 dye
(J. clin. Investig., 1950, 29, 258)
- 32 - NYLIN G.
Blood volume determination with radioactive phosphorus
(Brit. Heart J., 1945, 7, 81)
- 33 - NYLIN G.
Circulatory blood volume of some organs
(Amer. Heart. J., 1947, 34, 174)
- 14 - PHILIPPS R.A., YEOMANS A., DOLE V.P., FARR L.E., and VAN-
SLYKE D.D.
Estimation of blood volume from change in blood specific
gravity following a plasma infusion
(J. clin. Investig., 1946, 25, 261)

- 19 - POUILLAIN P. et PIETTE M.
Détermination de la masse sanguine par la polyvinylpyrrolidone.
(Bul. Soc. Biol., 1948, 30, 496)
- 21 - POZNANSKI W.J.
Dosage volumetrique du plasma sanguin
(Ann. Biol. clin., 1950, 3, 250)
- 35 - REEVE E.B. and VEALL N.
A simplified method for the determination of circulating red cell volume with radioactive phosphorus.
(J. Physiology., 1949, 108, 12)
- 4 - SMITH H.P., ARNOLD H.R. and WHIPPLE G.H.
Comparative Values of Welcker, Carbon Monoxide and Dye Method for Blood Volume Determinations - Accurate Estimation of Absolute Blood Volume.
(Amer. J. Physiology., 1921, 56, 337)
- 17 - SOMOGYI J.C.
Blutmengenbestimmungen am-Menschen mit dem Farbstoff Geigy - Bleu 536.
(Schweiz. med. Woch, 1941, 71, 225)
- 18 - STOLL G.
Etude critique de la détermination des volumes plasmatique et sanguin par le bleu de Geigy 536.
(Semaine des Hôpitaux, 1955, 5, B.227, numéro spécial de Biologie)
- 2 - VAQUEZ O.N., NEWERLY K., YALOU R.S. and BERSON S.A.
Determination of trapped plasma in the centrifuged erythrocytes volume of normal human blood with radioiodinated I^{131} human serum albumin and radiosodium Na^{24} .
(J. Lab. Clin. med., 1952, 39, 595).

T A B L E D E S M A T I E R E S

TABLE DES MATIERES

Page

<u>INTRODUCTION</u>	1
---------------------	---

PREMIERE PARTIE

POSITION DU PROBLEME PHYSIOLOGIQUE

Relation entre le sang et les autres secteurs liquides de l'organisme.	3
Secteur cellulaire	3
Secteur extracellulaire	4
Relation entre le sang et les liquides instertitiels	5
Relation entre les liquides extracellulaire et cellulaire	6
Méthodes générales de mesure des secteurs hydriques	8
a) - Mesure de l'eau totale de l'organisme	8
b) - Mesure des liquides extracellulaires - Calcul de l'eau cellulaire	8
c) - Mesure du volume plasmatique - Calcul de l'eau interstitielle	9
Le volume sanguin - Définition de la masse sanguine	10
Variations et régulations du volume sanguin	10
Variations physiologiques	12
Variations pathologiques	13
Quelle est la quantité de sang pouvant être perdue, sans conséquences fatales ?	15

L'hématocrite	15
Relations physiopathologiques entre l'hématocrite, le volume globulaire et le volume sanguin total	17
Dans la normovolémie	18
Dans l'hypovolémie et l'hypervolémie	18

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA MASSE SANGUINE

a) - Méthodes directes	22
I - Méthode de saignée	22
II - Méthode à l'oxyde de carbone	23
III- Méthode de la dilution des globules	25
IV - Méthode des groupes sanguins	26
b) - Méthodes indirectes	27
Mesure du volume plasmatique	27
I - Méthode aux colorants	27
- Principes généraux	28
Méthode au bleu de Chicago	29
Méthode au bleu Geigy 536	30
II - Méthode au Polyvinylpyrrolidone	34
- Etablissement de la courbe d'étalonnage	35
III- Méthode au tetraiodophenol-phtaleine (tétraïode)	37
IV - Méthode à la sérum albumine marquée à l'iode radioactif I^{131}	38
Mesure du volume globulaire	39
I - Méthode au fer radioactif Fe^{59}	39
II - Méthode au chrome radioactif Cr^{51}	41
III- Méthode au potassium radioactif K^{42}	42

TROISIEME PARTIE

<u>LA METHODE AU PHOSPHORE RADIOACTIF P^{32}</u>	43
---	----

Travaux antérieurs	45
--------------------	----

QUATRIEME PARTIE

TECHNIQUE DE MESURE DE LA MASSE SANGUINE

<u>PAR LE RADIOPHOSPHORE P^{32}</u>	57
--	----

A - Préparation des solutions de P^{32}	58
B - Préparation et lavage des globules marqués	59
C - Injection des globules marqués et prélèvements	61
D - Préparation de la suspension témoin et des échantillons pour la mesure	63
Préparation de la dilution de la suspension témoin	65
Préparation des échantillons pour la mesure	66
E - Mesure de la radioactivité	68
F - Calculs	69
Expérience n° 11	69

<u>R E S U L T A T S</u>	77
--------------------------	----

<u>C O N C L U S I O N S</u>	105
------------------------------	-----

<u>B I B L I O G R A P H I E</u>	111
----------------------------------	-----

Impr. LA PUBLIGRAPHIE, 191 rue de Tolbiac - PARIS XIII°

